

# BIODETERIORO DE MONUMENTOS DE IBEROAMÉRICA

**Editores**

**Cesáreo Sáiz Jiménez**

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España)

**Héctor A. Videla**

Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad nacional de La Plata (Argentina)



Subprograma XV

Corrosión e impacto ambiental sobre materiales

© Programa CYTED, 2002

Portada: Miguel A. Rogerio  
Diseño y Maquetación: Silvia Moya y  
Miguel A. Rogerio  
Edita: RTXV-E CYTED  
Imprime: Imprenta Oromana, S.A.L.  
Depósito Legal: SE-2559-2002  
I.S.B.N.: 84-699-7746-6

Impreso en España - Printed in Spain



# INDICE

	Página
Prefacio	
Biodeterioro del Patrimonio Cultural, biocorrosión y corrosión atmosférica. Similitudes y diferencias <i>Héctor A. Videla</i>	1
Pinturas acuosas a base de silicatos inorgánicos, modificadas con dispersiones poliméricas, para la protección del Patrimonio Cultural <i>Carlos A. Giúdice</i>	19
Os fungos como organismos deteriogênicos em prédios históricos construídos de pedra <i>Christine C. Gaylarde</i>	33
Métodos moleculares para detecção de fungos em biofilmes <i>Denise de Souza Saad, Graham Kingsey, Seungbum Kim</i>	45
Estudio comparativo de las comunidades bacterianas en monumentos mediante tecnicas moleculares y microbiológicas <i>Guadalupe Piñar, Werner Lubitz, Leonila Laiz, Cesáreo Sáiz Jiménez</i>	57
Sensores de pH medioambiental aplicables en la conservación preventiva de vidrios históricos <i>M.A. Villegas, F.J. Alguacil, M.A. García, J. Llopis</i>	81
Colonización de monumentos y construcciones pétreas por los líquenes. Estudios realizados en la Península Ibérica <i>Xavier Ariño Vila, Antonio Gómez Bolea</i>	95
Monitorización en continuo de parámetros microambientales en sistemas kársticos someros. Aplicación a la conservación del arte prehistórico (Cueva de Altamira, España) <i>S. Sánchez Moral, J. Bedoya, V. Soler, J.C. Cañaveras</i>	109
Alteración del granito por acción de los líquenes. Aspectos biogeofísicos y biogeoquímicos <i>B. Prieto, T. Rivas, B. Silva</i>	125

Ecología microbiana en ambientes hipogeos: utilización de fuentes de carbono en función de la temperatura <i>M. González del Valle, L. Laiz, A. Ortiz Martinez, Cesáreo Sáiz Jiménez</i>	149
Estado del arte en el deterioro de monumentos y morteros antiguos orgánicos para su restauración <i>Elia Alonso, Lorenzo Martínez Gómez</i>	165

## PREFACIO

El patrimonio cultural comprende los bienes muebles, inmuebles e inmateriales de interés histórico, artístico, arquitectónico, paleontológico, arqueológico, etnográfico, científico y técnico, además del patrimonio bibliográfico y documental. Se trata de preservar el patrimonio en su mejor condición para poder asegurar así su existencia durante muchas generaciones.

Lamentablemente, sabemos que ese deseo es imposible de cumplir por la tendencia natural de los materiales a deteriorarse a través del tiempo. Uno de los aspectos menos estudiados en la conservación del patrimonio cultural es el papel que los organismos y, en especial, los microorganismos, juegan en los procesos de deterioro.

El biodeterioro de materiales se define como todo cambio indeseable en las propiedades de un material, causado por la actividad de los organismos. Al desarrollo de los organismos contribuye las condiciones climáticas y microclimáticas, por ejemplo la elevada humedad relativa, elevadas temperatura en países tropicales, contaminación natural y antropogénica, que son muchas veces importantes coadyuvantes de los procesos de biodeterioro.

La Red Temática XV-E (Preservar) del programa CYTED sobre Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental tiene como objetivos principales: EVALUAR los efectos de los parámetros ambientales sobre el patrimonio cultural Iberoamericano, IDENTIFICAR los agentes del deterioro biológico y sus principales mecanismos de acción, DIFUNDIR la experiencia y conocimiento de especialistas iberoamericanos en este campo de estudio multidisciplinario, y TRANSFERIR el conocimiento a través de cursos, talleres, comunicaciones a congresos y publicaciones especializadas. El cumplimiento de esos objetivos ha de ayudar a DESARROLLAR estrategias de prevención y protección contra el biodeterioro del patrimonio cultural mediante el intercambio de experiencias entre los especialistas integrantes de la red con profesionales de centros de investigación y universidades de los países iberoamericanos.

Dentro del contexto de los objetivos de la red Preservar, el presente libro reúne las comunicaciones de los delegados de la red temática al curso sobre "Biodeterioro de Monumentos de Iberoamerica", realizado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC) en el mes de febrero de 2001. Asimismo se incluyen las comunicaciones de algunos miembros de la red temática del CSIC "Patrimonio Histórico y Cultural", que han colaborado en la edición de este volumen.

Cesáreo Saiz Jiménez  
Delegado Español RT XV-E

Héctor A. Videla  
Coordinador Internacional RT XV-E

Sevilla, Junio de 2002.

# BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL, BIOCORROSION Y CORROSION ATMOSFERICA. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS

Héctor A. Videla

*Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas.*

*Universidad Nacional de La Plata*

*Av. 51 – No. 337. La Plata. 1900. Argentina*

*e-mail: hvidela@infovia.com.ar*

## RESUMEN

El biodeterioro del patrimonio cultural, definido como el daño físico o químico efectuado por organismos biológicos en objetos, monumentos o edificios pertenecientes a la propiedad cultural, es influido por dos factores fundamentales: el medio ambiente y los organismos que crecen sobre o dentro del sustrato a degradar.

Dentro de los procesos de deterioro abiótico relacionados con los factores ambientales tenemos los fenómenos de corrosión atmosférica de metales y el deterioro atmosférico (intemperismo) de los materiales (metálicos o no) en general. Dentro de los procesos biológicos de deterioro distinguimos los procesos de degradación biológica de materiales naturales o procesados, estructuras o edificios que denominamos genéricamente como procesos de biodeterioro y los procesos electroquímicos de disolución metálica inducidos o acelerados por microorganismos que denominamos biocorrosión. Existen similitudes y diferencias entre los procesos de biodeterioro, biocorrosión y corrosión atmosférica que han originado frecuentes confusiones y una inadecuada utilización de conceptos en áreas de estudio multidisciplinarias como la que nos ocupa. El presente trabajo tiene como objetivo clarificar los alcances y limitaciones de cada uno de esos conceptos cuando se aplican al estudio del deterioro (biológico o abiótico) del patrimonio cultural.

**Palabras clave:** biodeterioro, biocorrosión, corrosión atmosférica, biofilms, patrimonio cultural.

## INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas asociadas a los procesos de biodeterioro crecen bajo la forma de *biofilms* constituidos por células microbianas, material polimérico extracelular (MPE) de naturaleza polisacáridica, partículas de origen diverso y un alto porcentaje de agua (aproximadamente 95% del peso del biofilm), formando películas



mucilaginosas (Geesey, 1982) adheridas al sustrato al cual no sólo lo degradan sino que lo afectan en su aspecto estético.

La importancia de los biofilms en el biodeterioro de materiales está relacionada con las drásticas modificaciones que producen en los valores de pH, concentraciones iónicas y condiciones de óxido-reducción en la interfase entre el sustrato y el medio circundante. Estos cambios en las características fisicoquímicas de la interfase crean áreas localizadas de gran agresividad que están ausentes en las zonas no cubiertas por el biofilm como se ha publicado (Videla y Characklis, 1992) para el ataque de metales y aleaciones en medios industriales.

Los biofilms que crecen sobre metales y aleaciones son causantes de la disolución del sustrato por un proceso electroquímico que se desarrolla en la zona anódica, si bien también pueden inducir o acelerar un proceso de biocorrosión facilitando la reacción catódica de manera indirecta como se ha reportado para las bacterias anaeróbicas reductoras de sulfatos (BRS) en la corrosión del acero al carbono (Videla, 1996; 2000).

Los biofilms microbianos que crecen sobre la piedra pueden causar su deterioro químico o físico a través de diferentes mecanismos *biogeoquímicos* que alteran la apariencia estética y la integridad del material estructural, por lo cual estos procesos tienen gran importancia en el biodeterioro de monumentos de piedra del patrimonio cultural (Warscheid y Krumbein, 1996). Dentro de los procesos de deterioro biogeoquímico, el más frecuente se produce a través de la producción metabólica de ácidos tanto orgánicos como inorgánicos que disuelven la matriz del sustrato por un proceso de *biolixiviación* de ciertos componentes minerales del material estructural.

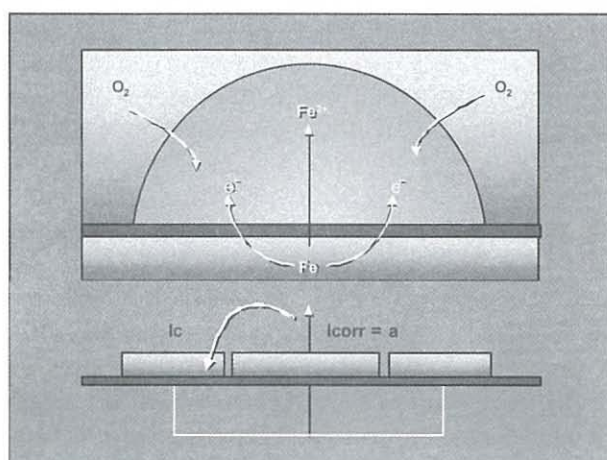
Tanto los suelos como la piedra constituyen ambientes heterogéneos respecto a su contenido de materia orgánica, pH, potencial redox, temperatura y presencia de humedad. Esta heterogeneidad origina variaciones en el número y actividad de los microorganismos (Videla, 2002).

Este trabajo tiene por objetivo esclarecer los conceptos básicos de dos de los procesos que participan en el deterioro de objetos y edificios pertenecientes al patrimonio cultural: a) procesos de biocorrosión de metales y aleaciones; b) procesos de *corrosión atmosférica* y deterioro atmosférico o *intemperismo*. En una última parte se presentarán ejemplos de sitios arqueológicos donde se ha encontrado la predominancia de uno u otro de esos procesos en detrimento del otro o bien un sinergismo entre ambos para acelerar la degradación del material estructural.

## BIOCORROSION (Corrosión microbiológica)

La *corrosión* puede definirse como el ataque sufrido por un metal por su reacción con el medio ambiente, con el consiguiente deterioro de sus propiedades. Este proceso está termodinámicamente favorecido por la tendencia natural de los metales (excepto los metales nobles) a evolucionar de la forma elemental a la de combinación química. Una pieza metálica permanecería estable en contacto con la atmósfera durante un tiempo indefinido siempre que su superficie estuviera libre de humedad. La presencia de agua facilita el desarrollo de reacciones de transferencia de carga entre la superficie metálica y el medio ambiente, debido a que la corrosión es un proceso *electroquímico* que precisa de un medio acuoso (electrolito) para ocurrir. La corrosión abiótica transcurre entonces en la interfase entre dos elementos el metal y el electrolito (Videla, 1991).

Cuando un metal se corroe se producen iones metálicos que son transferidos al medio líquido mientras que los electrones fluyen a otra área donde son consumidos para cerrar así un circuito eléctrico. La reacción de corrosión es entonces un proceso anódico (reacción de oxidación) mientras que otro proceso catódico (reacción de reducción) consume los electrones producidos en el ánodo. La velocidad de la reacción de corrosión será directamente proporcional a la corriente anódica o a la *densidad de corriente*, cuando está referida a la unidad de área (Figura 1).

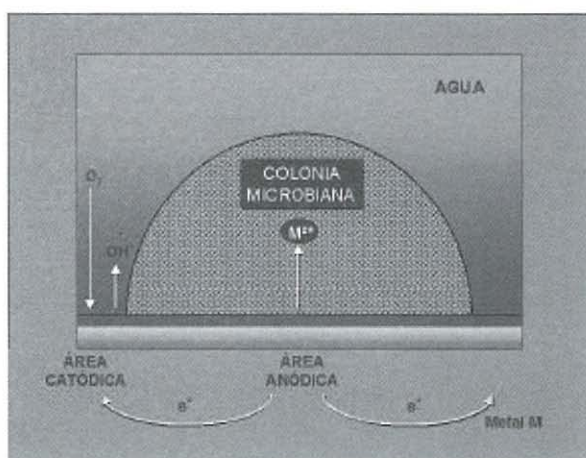


**Figura 1:** Proceso de corrosión abiótico: disolución del hierro bajo una gota de agua.

En la corrosión abiótica las dos reacciones catódicas más frecuentes son: i) la reducción de oxígeno (en medio neutro y aireado) y

ii) la reducción de protones (en medios de-aireados de bajo pH). En una situación intermedia (por ej. soluciones ácidas aireadas) como los protones son más fácilmente reducidos que el oxígeno, su reducción será la reacción catódica predominante. Cuando una superficie metálica se corroe, se forman productos de corrosión que pueden brindar protección frente al medio corrosivo. En la medida en que estos films sean adherentes, resistiendo a su remoción por agentes físicos o se regeneren fácilmente si se rompen, han de proteger al metal de la agresividad del medio y la velocidad de la reacción de corrosión disminuirá o se hará nula. Este fenómeno se denomina *pasividad metálica*.

En la biocorrosión, los microorganismos participan en la reacción de corrosión **sin cambiar la naturaleza electroquímica del proceso** (Figura 2). No obstante, su rol es sumamente importante pues crean condiciones para que la corrosión se inicie o se acelere una vez que se ha establecido. La forma de ataque más frecuente es por corrosión localizada: picado (*pitting*), o en rendijas (*crevice*), que son los tipos de corrosión más perjudiciales por la alta velocidad en que se atraviesa el espesor de una estructura.



**Figura 2:** Proceso de biocorrosión: disolución del hierro bajo una colonia microbiana.

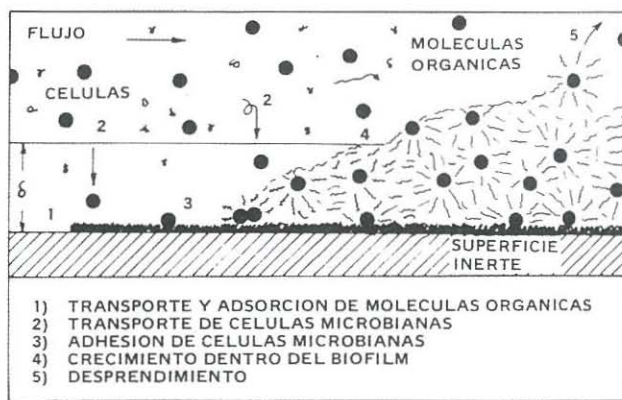
En la biocorrosión existen tres elementos participantes en el proceso: el metal, la solución y los microorganismos y de su interacción dependerán las características generales de la reacción de corrosión.

Los microorganismos participan en el proceso de corrosión cambiando las condiciones electroquímicas en la interfase metal/solución. Estos cambios pueden inducir, acelerar o hasta inhibir el proceso de corrosión mediante la formación de un film protector, por



ejemplo (Videla, 1996). Ambos procesos, si bien opuestos, están estrechamente relacionados con la presencia de biofilms microbianos en la interfase entre el metal y el medio circundante.

La formación de un biofilm es un proceso acumulativo no uniforme ni en el tiempo ni en el espacio (Characklis y Marshall, 1990). En la Figura 3 se muestran las secuencias de formación de un biofilm sobre una superficie metálica, inicialmente limpia, en un medio líquido con flujo como ocurre en muchos sistemas naturales e industriales (Chracklis, 1981).



**Figura 3:** Distintas etapas de formación de un biofilm en un sistema con flujo líquido.

Los biofilms pueden modificar la velocidad de corrosión y hasta inhibirla mediante algunos de los siguientes efectos (Videla, 1995) :

- 1) Alterando el transporte de iones desde o hacia la superficie metálica.
- 2) Facilitando la remoción de películas protectoras cuando estas acompañan el desprendimiento del biofilm
- 3) Creando condiciones de aireación diferencial debido a una distribución no uniforme del biofilm sobre la superficie metálica (ver Figura 2).
- 4) Modificando las condiciones redox de la interfase (por ej: a través del consumo respiratorio de oxígeno).
- 5) Facilitando la disolución o remoción de películas de productos de corrosión protectores sobre el metal.

Los mecanismos clásicos de biocorrosión (Videla 1986) pueden resumirse así:

- 1) Producción de metabolitos corrosivos que aumentan la agresividad de un medio respecto al metal.



- 2) Creación de condiciones de aireación diferencial sobre la superficie.
- 3) Ruptura de películas pasivas o cubiertas protectoras por acción del metabolismo microbiano.
- 4) Consumo microbiano de inhibidores de corrosión.
- 5) Aceleración de una de las reacciones del proceso de corrosión. Esta aceleración, según sobre qué reacción se producen se denominan *despolarización anódica* o *catódica*).

Generalmente estos mecanismos operan simultánea o consecutivamente, pero es muy infrecuente que uno solo de ellos sea el responsable de la biocorrosión (Videla, 1986).

## **CORROSION ATMOSFERICA**

A temperatura ambiente moderada y en ausencia de humedad la corrosión metálica progresa a una velocidad insignificante y a los efectos prácticos puede ser ignorada, pero adquiere importancia sobre superficies húmedas. Su mecanismo es electroquímico y el electrolito está constituido ya sea por una película delgada de humedad o bien por una película acuosa (de centenares de micrómetros de espesor) cuando el metal aparece perceptiblemente mojado. (Feliu y Morcillo, 1991).

Por lo antes expuesto, gran parte de los daños ocasionados por la corrosión atmosférica son debidos a la condensación de humedad por el enfriamiento periódico del aire. El proceso de condensación depende de la *humedad relativa* (HR) del aire y del cambio de temperatura. Por debajo de un nivel de HR entre 60-80% la corrosión del hierro es despreciable aunque esta condición varía de metal en metal (Morcillo, 1998).

La lluvia, nieve o niebla y la condensación de humedad por cambios de temperatura (rocío) son los principales causantes de la corrosión atmosférica. La suma de tiempos parciales de humectación constituye el denominado *tiempo de humectación* (TDH) durante el cual es posible la corrosión metálica. Existe una buena correlación entre el TDH y el tiempo en que la HR supera un nivel de humedad mayor al 70%. Cuando se yuxtaponen condiciones de alta humedad juntamente con altas temperaturas se favorecen procesos de deterioro de materiales por causas abióticas (corrosión) y bióticas (biodeterioro). En muchas de las zonas en donde se encuentran ubicados los sitios arqueológicos pertenecientes al patrimonio cultural Iberoamericano las condiciones ambientales responden a esas características, a lo cual se suman los factores derivados de la polución natural y antropogénica (Videla, 1998).

Una relación que vincula factores ambientales con el deterioro del sustrato es el denominado *índice de deterioro de Brooks* ( I ) :

$$I = (HR-65) P / 100$$

Donde HR es el porcentaje de humedad relativa media anual y P la presión de saturación del vapor de agua en la atmósfera expresada en mbar (a la temperatura media anual). Mediante el uso de este parámetro se pueden establecer los siguientes grados de deterioro:

**TABLA 1**

Deterioro de materiales en la atmósfera según el índice de Brooks (Morcillo, 1998)

I	Grado de deterioro
< 1	muy bajo
entre 1 y 2	bajo
entre 2 y 5	moderado
> 5	alto

Los factores primarios determinantes de la intensidad del proceso de corrosión atmosférica son: i) vida media de la película de humedad sobre el metal; ii) concentración de contaminantes atmosféricos; iii) temperatura ambiente.

El proceso catódico que frecuentemente acompaña a la reacción anódica de disolución metálica es la reducción del oxígeno y por ello la difusión del oxígeno a través de la película acuosa suele controlar la velocidad de corrosión. Sólo en casos de alta contaminación ácida de la película de humedad sobre la superficie metálica, la reducción de protones puede ser predominante.

Otro concepto importante para el estudio del deterioro de materiales en la atmósfera es el de microclima que puede definirse como el clima localizado que se forma alrededor del sustrato. Entre los factores que determinan el microclima se encuentran: la formación de rocío o en general el TDH, la temperatura y la presencia de aniones de naturaleza ácida ( $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{Cl}^-$ ) en la película acuosa depositada sobre el material.

La influencia de la contaminación atmosférica es fundamental para que el proceso de corrosión sea significativo. El cloruro de sodio y el dióxido de azufre son los principales contaminantes y agentes corrosivos atmosféricos. El primero se incorpora a la atmósfera desde el mar cuando el aire transporta sal y se produce una continua pulverización de agua constituyendo la denominada niebla salina. El dióxido de azufre se encuentra en atmósferas impurificadas por la



actividad industrial y proviene de la quema de combustibles conteniendo azufre. La fuente natural de dióxido de azufre es la actividad volcánica y representa aproximadamente la mitad del producido mundial.

El dióxido de azufre atmosférico puede ser oxidado y convertido en ácido sulfúrico o bien eliminado en forma de depósito sobre agua, plantas y edificios. Por depósito húmedo se entiende el retorno del ácido sulfúrico a la superficie terrestre, sobretodo por acción de la lluvia originando la denominada lluvia ácida.

El ion cloruro de origen marino puede presentarse como cloruro de sodio disuelto en la niebla salina o como sal sódica después de la evaporación. Ambas formas alcanzan en la atmósfera concentraciones entre 0,5 y 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Otras fuentes naturales de contaminación de la atmósfera por cloruros son: gases de volcanes en erupción y actividades antropogénicas. El depósito salino acelera la corrosión sobre todo si los productos de corrosión son solubles pues elevan la conductividad de la película acuosa sobre el metal y eventualmente inducen la ruptura de películas pasivantes. Las variables más importantes que influyen sobre la salinidad de la atmósfera son el régimen de vientos dominante, distancia a la costa, topografía de la zona, altitud, etc.

Otros contaminantes atmosféricos de importancia para la corrosión metálica son los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), de los cuales se han contabilizado entre los más importantes el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), el óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) y su origen puede ser tanto natural como antropogénico. El  $\text{N}_2\text{O}$  proviene fundamentalmente de la actividad biológica del suelo mientras que el  $\text{NO}$  y el  $\text{NO}_2$  provienen casi siempre de la actividad de procesos de combustión a alta temperatura (tormentas eléctricas, plantas industriales, centrales térmicas y sobre todo motores de combustión interna).

Se encuentran cantidades entre 0,47  $\mu\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}_2$  (ambientes rurales) hasta 1,6-376  $\mu\text{g m}^{-3}$  (ambientes urbanos). Los valores encontrados para el  $\text{NO}$  son aproximadamente del mismo orden.

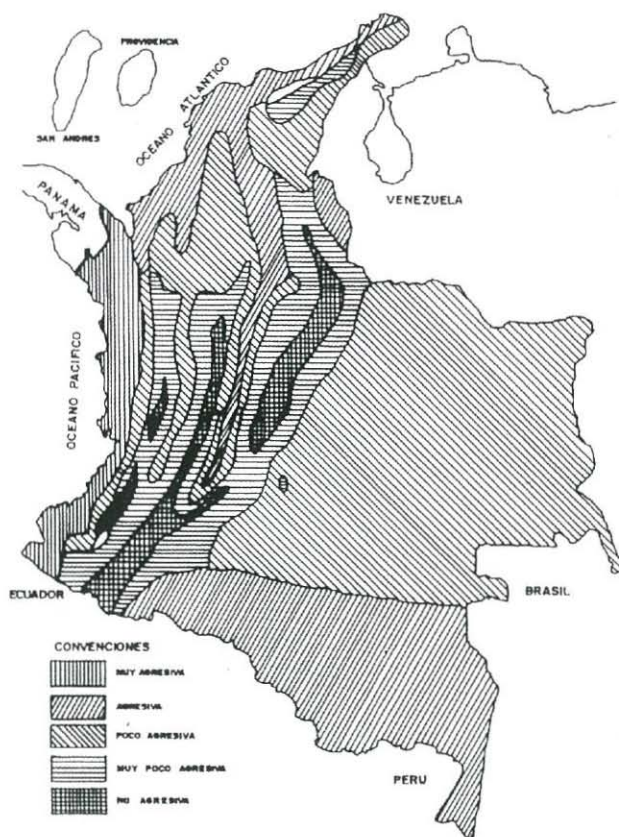
El dióxido de carbono atmosférico se encuentra en niveles de 0,03 a 0,05% en volumen y variando según la estación del año debido a su ciclo en la naturaleza. Los valores mencionados equivalen a una concentración del orden de 10-5 moles/l de agua siempre que el valor de pH sea igual o inferior a 6,0.

Un concepto importante en el estudio del deterioro atmosférico de materiales y la corrosión atmosférica de metales es el de agresividad atmosférica.

Existen diferentes criterios y parámetros para clasificar la agresividad de la atmósfera sobre los materiales aunque diversos comités técnicos de ISO vienen trabajando en la elaboración de normas que permitan clasificar las atmósferas desde el punto de vista de su

corrosividad. Con relación a la corrosividad atmosférica la normativa ISO 9223 establece 5 categorías de corrosividad para cuatro de los metales más comúnmente usados en la construcción (acero al carbono, zinc, cobre y aluminio) y también categorías diferentes de atmósferas basadas en los tiempos de humectación, concentración de dióxidos de azufre y cloruros.

Como una consecuencia directa de la elaboración de normativas para clasificar la corrosividad atmosférica se han elaborado mapas de corrosividad atmosférica que permiten tener una información visual sobre el alcance del fenómeno de corrosión atmosférica en un determinado punto geográfico y poder elegir el material más adecuado o realizar estimaciones ya sea económicas o implementar posibles medidas de protección y prevención. Estos mapas pueden corresponder a una región, un país (Figura 4) o a todo un continente.



**Figura 4:** Mapa de corrosividad atmosférica de Colombia basado en el Índice de deterioro de Brooks (de Morcillo et al. 1998).



En relación al tema que nos ocupa, la prevención y protección del patrimonio cultural Iberoamericano de los efectos del biodeterioro ambiental, el proyecto MICAT del subprograma XV del CYTED ha publicado recientemente un libro con información muy completa sobre la corrosión y protección de metales en las atmósferas de Iberoamérica que incluye un atlas de corrosividad de las distintas atmósferas de Iberoamérica (Morcillo et al., 1998). Lamentablemente esa información está limitada a los materiales metálicos y su extrapolación a la piedra no es frecuentemente directa.

## BIODETERIORO DE MATERIALES

Los microorganismos involucrados en los procesos de biodeterioro incluyen a bacterias fototróficas del tipo de las cianobacterias, bacterias heterotróficas como las bacterias acidificantes, los hongos, los líquenes y finalmente los musgos y plantas superiores.

Las cianobacterias por sus características metabólicas (fototróficas y autotróficas) son generalmente los colonizadores primarios de la piedra, sirviendo luego como fuente de carbono para el crecimiento de las comunidades bacterianas y fúngicas heterotróficas. Si bien su acción biodeteriorante es aun discutida, son las responsables de la formación de costras pigmentadas, generalmente de color oscuro, que afectan al sustrato estéticamente (Figura 5).



**Figura 5:** Costras oscuras de cianobacterias sobre los muros del Templo de los Jaguares, adyacente al juego de la pelota en Chichen Itza, estado de Quintana Roo, México.

En ambientes interiores no expuestos en forma directa a la atmósfera las patinas y biofilms microbianos son generalmente más abundantes y de colores más claros con tonalidades que van del verde al marrón oscuro (Figura 6).



**Figura 6:** Costras de color verde a marrón oscuro en la galería interna de la entrada al templo de Kukulcan en la plataforma superior de la gran pirámide de Chichen Itza, estado de Quintana Roo, México

Las bacterias heterótrofas que atacan la piedra de monumentos y edificios del patrimonio cultural presentan un amplio espectro de características taxonómicas y metabólicas. Específicamente, en sitios históricos de la arquitectura maya, se han aislado bacterias heterótrofas esporuladas del género *Bacillus* (Guamet et al., 1998) con una marcada acción acidificante (efecto posteriormente corroborado en ensayos de laboratorio), bacterias productoras de biofilms mucilaginosos del género *Pseudomonas* y bacterias heterótrofas anaeróbicas reductoras de sulfatos (BRS) (Videla et al., 2000), entre las más frecuentes.

Los hongos deterioran la piedra tanto química como mecánicamente por la penetración del micelio fúngico en las grietas o fisuras en las cuales desarrollan (crecimiento casmolítico). Su acción deteriorante se manifiesta en la gran mayoría de los casos por la producción de metabolitos ácidos que disuelven los componentes químicos de la matriz del material debilitando sus características estructurales.

Los líquenes (asociación simbiótica de hongos y algas) están relacionados con el biodeterioro de la piedra de una manera similar a los musgos y plantas superiores (Monte, 1991). Su acción agresiva



generalmente está ligada a la producción de ácido oxálico que combinado con el calcio del sustrato precipita como oxalato de calcio hidratado, formando pátinas de oxalato. Por su alta resistencia a ambientes de baja humedad y por su requerimiento de bajos niveles de nutrientes, los líquenes se encuentran dentro de los primeros colonizadores de la piedra y también dentro de los microorganismos más resistentes a situaciones ambientales adversas.

Por último, los musgos pueden a través de los rizoides penetrar en la piedra produciendo fisuras o agujeros (pitting) (García de Miguel et al., 1995). Las plantas vasculares pueden causar un tipo de biodeterioro predominantemente mecánico (por la penetración de las raíces en el sustrato y en el mortero) y químico por la acidez excretada por las raíces (Saiz Jiménez, 1994).

Los procesos de biodeterioro de la piedra pueden subdividirse en dos grandes tipos: a) procesos *biogeoquímicos* y b) procesos *biogeo físicos*, según las características del daño producido al material estructural (Warscheid y Krumbein, 1996). Dentro de los primeros, la producción metabólica de ácidos orgánicos e inorgánicos conduce a una biolixiviación de los elementos constitutivos del sustrato. Estos procesos generalmente se combinan con la oxidación biogénica (bio-oxidación) del mineral, que produce cationes y provoca un debilitamiento de las uniones estructurales del material.

La producción de metabolitos ácidos es posiblemente el más estudiado y verificado de los mecanismos de biodeterioro microbiológico de la piedra y es denominado por varios autores como biocorrosión, por las morfología del ataque que se verifica en muchos casos como un desgaste localizado de la superficie, ya sea bajo la forma de pitting o exfoliación o bien por la disolución uniforme de la misma. A nuestro entender, el uso de la palabra biocorrosión para denominar el biodeterioro de la piedra por metabolitos ácidos es incorrecto, ya que ese término debe ser restringido a los procesos de oxidación electroquímica del sustrato, que caracterizan al proceso anódico de disolución metálica (corrosión), pero que no es el caso del biodeterioro de la piedra (Videla, 1996).

Dentro de los procesos de biodeterioro biogeo físicos, se incluyen a aquellos cambios materiales y estructurales de la superficie de la piedra que transcurren a través de la formación de diversos tipos de pátinas. La formación de diversos estratos o capas debida a cambios químicos en el material y de su estructura superficial puede llevar a la producción de costras cristalinas o a incrustaciones amorfas o cristalinas (Warscheid y Krumbein, 1996).

Además de los cambios de coloración superficial debidos a pigmentos inorgánicos o biológicos, los biofilms microbianos epilíticos pueden producir metabolitos tensioactivos que alteran la difusión del

vapor de agua en los poros de la piedra provocando dilataciones y contracciones de los depósitos biológicos, efectos que se suman a la acción mecánica de penetración de las hifas fúngicas y liquénicas en el material estructural.

Finalmente, estos procesos biogeofísicos de deterioro de la piedra sinergizan con los procesos de daño puramente físico debidos a los ciclos de formación de escarcha y deshielo, y a la presión de cristalización de sales inorgánicas depositadas en la superficie.

Es frecuente encontrar en la literatura especializada en corrosión atmosférica, un desconocimiento total de los fenómenos de biodeterioro microbiológico y sobre todo de la estrecha vinculación entre el biodeterioro y los factores ambientales. Una prueba de ello, es que en el programa internacional cooperativo (PIC) dentro del marco de la Comisión Europea y las Naciones Unidas, para la evaluación de los efectos de la contaminación atmosférica en los materiales y monumentos históricos y culturales, sólo se mencionan dentro de aquéllos a dos materiales (la arenisca dolomítica y la caliza de Pórtland) que poco tienen que ver con el material estructural de los monumentos de la civilización maya por ejemplo. Por otra parte, en las normativas del programa se consideran solamente ensayos para evaluar el efecto de la humedad relativa y los agentes químicos agresivos ( $\text{SO}_2$ , por ejemplo) ignorando por completo la evaluación del efecto de los microorganismos y los biofilms microbianos en el deterioro del material estructural. La confusión existente se agrava más aun cuando se pretende extrapolar a la piedra, resultados de ensayos de intemperismo ambiental desarrollados para metales y aleaciones usados en la construcción moderna.

### **ALGUNOS EJEMPLOS DE DETERIORO ATMOSFÉRICO (INTEMPERISMO) Y BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL IBEROAMERICANO**

Hemos publicado recientemente (Videla et al., 2001) un estudio sobre los mecanismos del biodeterioro microbiológico de la piedra caliza en sitios de la arquitectura maya ubicados en lugares con características ambientales muy diferentes: el núcleo urbano de Uxmal que forma parte de la ruta Puuc, localizado en un área rural distante 60 km del mar y 30 km del área urbana de Mérida y la fortaleza de Tulum, enclavada sobre un arrecife al lado de la costa del mar Caribe.

En Uxmal, así como en otros sitios de la ruta Puuc, como Kabah, Sayil y Labna, se observaron costras de color marrón oscuro a negruzco en las paredes de los edificios expuestas a la acción del ambiente (luz solar directa, lluvia y viento) y pátinas abundantes de color verdoso a



marrón oscuro en los compartimientos internos o ambientes cubiertos de los edificios, que no se encuentran expuestos a la acción directa de la atmósfera. La copiosidad de los biofilms microbianos observados en los ambientes interiores de estos edificios es en parte debida al suministro adicional de materia orgánica provisto por las excretas de pájaros y murciélagos que frecuentemente se albergan en esos recintos.

Muestras (obtenidas mediante una metodología adecuada a la preservación del patrimonio en estudio) se analizaron a través del uso de técnicas microbiológicas de aislamiento, cultivo e identificación taxonómica, mediante observaciones de microscopía óptica, microscopía de barrido de electrones (MEB) y de barrido de electrones ambiental (MEBA), complementadas con análisis de superficie por dispersión de energía de rayos X (EDAX) y microsonda electrónica.

La presencia de diversos tipos de cianobacterias de formas filamentosas o cocales, fue constatada en todos los casos en coincidencia con información disponible en la literatura (Gaylarde y Gaylarde, 1998). Las observaciones de MEB y MEBA permitieron constatar que tanto las cianobacterias como los organismos heterótrofos colonizaban la estructura cristalina de la roca. Las biopelículas de algas y cianobacterias parecen participar en los procesos de biodeterioro sirviendo de soporte a la población microbiana heterotrófica y a través de la degradación directa de los componentes del sustrato (Hernández et. al, 1998).

En los diversos sitios de muestreo también se aislaron microorganismos heterotróficos como bacterias y hongos. Con estos microorganismos, fueron realizados ensayos de laboratorio utilizando bacterias del género *Bacillus* y hongos del genero *Aspergillus* empleando un medio mineral simplificado (Videla et al., 2001) con el agregado de glucosa al 1% en el caso de bacterias y 2% en el caso de hongos, para facilitar el crecimiento microbiano y verificar la capacidad acidificante de los microorganismos. El pH del medio se ajustaba a un valor de 7.0 y el descenso del mismo se evaluaba en función del tiempo de cultivo.

El crecimiento de los microorganismos testeados inducía descensos en los valores de pH del orden de 3 a 4 unidades en casi todos los casos. Esta marcada acidificación provocada por el crecimiento de los organismos heterótrofos sugiere que uno de los mecanismos de biodeterioro puede transcurrir a través del ataque ácido a la estructura de la roca por un mecanismo biogeoquímico de solubilización metabólica (biosolubilización) de los elementos estructurales del mineral.

Según estudios realizados sobre el biodeterioro del concreto (McCormack, 1996), el calcio puede ser desplazado de la matriz binaria

de calcita a través de un intercambio de iones que involucra a los iones de amonio y magnesio. Según estos autores la liberación de sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio pueden ser utilizados como indicadores del grado de biodeterioro. Según nuestros resultados (Videla et al., 2000; 2001) los perfiles de EDAX realizados sobre muestras de depósitos biológicos obtenidos en paredes de ambientes interiores de la casa de los gobernadores en Uxmal (donde los biofilms eran muy abundantes y predominantemente de color verdoso), revelaron porcentajes elevados de calcio seguidos por porcentajes mucho menores de cloro, aluminio, azufre, silicio y magnesio. Por otro lado, los perfiles EDAX realizados con las muestras de costras negruzcas presentes en muros exteriores expuestos a la intemperie, mostraron porcentajes similares de calcio (claramente el porcentaje elemental más elevado), cloro, azufre y silicio, aunque concentraciones ligeramente menores de magnesio, sodio y aluminio.

En los perfiles de EDAX de muestras de depósitos biológicos tomados en diversos lugares de la fortaleza de Tulum (cubículo lateral del Castillo, Templo del Viento, muro perimetral y en una pared de la casa del Cenote), su pudieron observar concentraciones muy elevadas de cloro (de la atmósfera marina) y de calcio (de la biosolubilización de la piedra caliza) y concentraciones mucho menores de azufre, sodio, aluminio y silicio. En los espectros EDAX la relación de las alturas de los picos de calcio y cloro podía invertirse según el lugar de muestreo y su proximidad con el mar.

Resultados de estudios de intemperismo atmosférico (Maldonado et al, 1998; Videla et al, 2001) muestran que los promedios anuales de poluentes atmosféricos como cloruro y dióxido de azufre son claramente mas elevados en la fortaleza de Tulum que en centro urbano de Uxmal (Tabla 2) ratificando la mayor agresividad de la atmósfera marina en el primer caso.

**TABLA 2**

Promedio anual de poluentes atmosféricos en los sitios arqueológicos de Uxmal y Tulum (Videla et al., 2001).

Sitios arqueológicos	Cl <sup>-</sup> (mg/m <sup>2</sup> .d) <sup>-</sup>	SO <sub>2</sub> (mg/m <sup>2</sup> .d) <sup>-</sup>
Uxmal	4.94	0.16
Tulum	487.93	5.97

Período de enero a diciembre de 1998.

Mediante una ponderación comparativa de la información obtenida del estudio de los depósitos biológicos y los ensayos de intemperismo atmosférico efectuados en edificios de la ruta Puuc y en la fortaleza de Tulum puede concluirse que el deterioro de la piedra caliza ha de estar



principalmente condicionado por factores atmosféricos en ambientes agresivos como Tulum donde -si bien el biodeterioro también está presente- no es el factor determinante del desgaste del material estructural. En ambientes rurales de baja agresividad atmosférica (Uxmal y ruta Puuc), debe atribuirse a los contaminantes biológicos y a los biofilms microbianos la principal contribución en la degradación de la piedra caliza.

Para un adecuado entendimiento de los diferentes procesos de deterioro que afectan al patrimonio cultural Iberoamericano es necesario distinguir claramente las similitudes y diferencias que caracterizan a los diferentes procesos según su origen (biológico o abiótico) y según la naturaleza del material estructural afectado (metálico o no metálico). A manera de síntesis se resumen en la Tabla 3 las similitudes y diferencias que caracterizan a cada tipo de proceso.

**TABLA 3**

Similitudes y diferencias entre los procesos de deterioro que afectan al patrimonio cultural

Proceso	Naturaleza	Origen	Material afectado
<b>Biodeterioro</b>	Química o biogeoquímica	Biológico	Piedra, madera, papel y otros materiales no metálicos
<b>Biocorrosión</b>	Electroquímica	Biológico	Metales y aleaciones
<b>Corrosión</b>	Electroquímica	Abiótico	Metales y aleaciones
<b>Corrosión atmosférica</b>	Electroquímica	Atmosférico	Metales y aleaciones
<b>Deterioro atmosférico (intemperismo)</b>	Química	Atmosférico	Piedra, madera y otros materiales no metálicos

**Agradecimientos:** Este trabajo es parte de las actividades desarrolladas dentro de la red temática XV-E (Preservar) del programa CYTED, al cual el autor desea expresar su reconocimiento así como al aporte económico del CONICET (PIP 4377/96) y de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PICT 6782/99). Se agradece la valiosa colaboración del Profesor Ricardo Echenique (UNLP) y de la Dra. Christine Gaylarde en la identificación de cianobacterias de la ruta Puuc y Tulum respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA

- Characklis, W.G. (1981). Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotech. Bioeng.* **XXIII**, 1923-1960.
- Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990). Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. En: Biofilms (Eds. W.G. Characklis, K.C. Marshall), John Wiley & Sons Inc., New York, 3-15.
- Feliu, S., Morcillo, M. (1991) Corrosión atmosférica. En: Corrosión y Protección Metalicas, vol.II, (Ed. S. Feliu, M.C. Andrade), CSIC, Madrid, 23-40.
- Garcia de Miguel, J.M.; Sánchez Castillo, L.; Ortega Calvo, J.J.; Gil, J.A., Saiz Jiménez, C. (1995) Deterioration of building materials from the Great Jaguar pyramid at Tikal, Guatemala, *Build. Environ.* **30**, 591-598.
- Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C. (1998) Phototrophic biofilms on monuments of cultural heritage in Latin America. En: LATINCORR/98 Proceedings, paper S11-03, NACE International, Houston, TX.
- Geesey, G.G. (1982) Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *Am. Soc. Microbiol. News* **48**, 9-14.
- Guíamet, P.S.; Gomez de Saravia, S.G., Videla, H.A. (1998) Biodeteriorating microorganisms of two archeological buildings at the site of Uxmal, México. LATINCORR'98 Proceedings. Paper S11-01, NACE International, Houston, TX.
- Hernández-Duque, G.; Ortega Morales, O.; Sand, W.; Josza, P.; Crassous, P.; Guezennec, J. (1998) Microbial deterioration of Mayan stone buildings at Uxmal, Yucatán, México. LATINCORR'98. Proceedings, Paper S11-04, NACE International, Houston, TX.
- Maldonado, L.; Díaz, L.; Cabrera Sansores, A.; Pacheco Avila, J., Halsey, D. (1998). Natural and accelerated dissolution of limestone used in monuments under tropical atmospheres, CORROSION/98, Paper No. 350, NACE International, Houston, TX.
- McCormack, K., Morton, L.H.G., Benson, J., Osborne, B.N., McCabe, R.W. (1996) A preliminary assessment of concrete biodeterioration by microorganisms. En: LABS 2, Proceedings Biodegradation & Biodeterioration in Latin America (C.C. Gaylarde, E.L. Saccol de Sá, P.M. Gaylarde, eds.), Porto Alegre, Brasil, 68-70.
- Monte, M. (1991). Multivariate analysis applied to the conservation of monuments: lichens on the Roman aqueduct Anio Vetus in S. Gregorio, *Int. Biodet.* **28**, 133-150.
- Morcillo, M. (1998) Fundamentos de la corrosión atmosférica de metales. Mapas de corrosividad atmosférica. En: Corrosión y Protección de Metales en las Atmósferas de Iberoamérica. Parte I. Mapas de Iberoamérica de Corrosividad Atmosférica, (Ed. M. Morcillo, E. Almeida, B. Rosales, J. Uruchurtu, M. Marrocos), CYTED, Madrid, 1-52.

- Morcillo, M., Uruchurtu, J., Chico, B. (1998) Atlas de corrosividad de las atmósferas de Iberoamérica. En: Corrosión y Protección de Metales en las Atmósferas de Iberoamérica. Parte I. Mapas de Iberoamérica de Corrosividad Atmosférica, (Ed. M. Morcillo, E. Almeida, B. Rosales, J. Uruchurtu, M. Marrocos), CYTED, Madrid, 717-787.
- Saiz Jiménez, C. (1994) Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. En: Biodeterioration Research 4 (G.C. Llewellyn, W.V. Dashek, C.E. O'Rear, eds.), Plenum Press, New York, USA, 587-604.
- Videla, H.A. (1986) Mechanisms of MIC. En: Proceedings of the Argentine-USA Workshop on Biodeterioration, (Ed. H.A. Videla), Aquatec Quimica, Sao Paulo, Brasil, 43-63.
- Videla, H.A. (1991) Microbially Induced Corrosion: an updated overview. En: Biodeterioration and Biodegradation 8 (Ed. H.W. Rossmore), Elsevier Applied Science, London, 63-88.
- Videla, H.A. (1995) Electrochemical aspects of biocorrosion. En: Bioextraction and Biodeterioration of Metals (Eds. C.C. Gaylarde, H.A. Videla), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 85-127.
- Videla, H.A. (1996) Practical cases: Biocorrosion of carbon steel in anaerobic environments. En: Manual of Biocorrosion, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 179-187.
- Videla, H.A. (1998) Biodeterioration of the Ibero American cultural heritage. A problem to be solved. En: 3<sup>rd</sup> Latin American Region Corrosion Congress (LATINCORR'98) CD Rom Proceedings, paper No. S 11-02, 5 pp, Cancun, Mexico (1998).
- Videla, H.A. (2000) An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments. *Biofouling* **15**, 37-47.
- Videla, H.A. (2002) Biodeterioro de monumentos históricos de la zona Maya. En: Memorias de las Jornadas sobre Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental (Ed. H.A. Videla), RT XV-E CYTED (en prensa).
- Videla, H.A., Characklis, W.G. (1992) Biofouling and microbiologically influenced corrosion, *Int. Biodet. Biodegr.* **29**, 195-212.
- Videla, H.A., Guiamet, P.S., Gómez de Saravia, S.G. (2000) Biodeterioration of Mayan archeological sites at the Yucatán Peninsula, México, *Int. Biodet. Biodegr.* **45**, 335-341.
- Videla, H.A., Guiamet, P.S., Gómez de Saravia, S.G., Maldonado, L. (2001) Mechanisms of microbial biodeterioration of limestone in Mayan buildings, CORROSION/2001, Paper No. 01250, NACE International, Houston, TX.
- Warscheid, Th., Krumbein, W.E. (1996) General aspects and selected cases. En: Microbially Influenced Corrosión of Materials (E. Heitz, H.C. Flemming, W. Sand, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 273-295.



# **PINTURAS ACUOSAS A BASE DE SILICATOS INORGÁNICOS, MODIFICADAS CON DISPERSIONES POLIMÉRICAS, PARA LA PROTECCIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL**

**Carlos A. Giúdice**

*Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT) y  
Universidad Tecnológica Nacional (UTN)  
Calle 52 el 121 y 122 – 1900 La Plata, Argentina  
TE: (54-221) 483-1142/4 e-mail: cagiudice@yahoo.com*

## **RESUMEN**

Los materiales de construcción deben necesariamente estar protegidos de la agresividad del medio ambiente para preservarlos a través del tiempo. Las pinturas actúan eficazmente, desde un punto de vista técnico-económico, como factor decorativo y protector. Aquéllas basadas en silicatos alcalinos como material formador de película constituyen sistemas de protección de larga tradición; por otra parte, las formuladas con dispersiones poliméricas de base acuosa tienen comparativamente una breve historia. Desde un punto de vista relativo presentan ventajas y desventajas. Los productos acuosos basados en silicatos inorgánicos y resinas en emulsión permiten aunar las propiedades características de cada material en pinturas de un solo componente; en este trabajo se incluyen aspectos relacionados a la formulación y al comportamiento en ensayos de laboratorio.

**Palabras clave:** dispersión polimérica, silicatos alcalinos, emulsión, coalescencia, adhesión, abrasión

## **INTRODUCCIÓN**

El patrimonio de muchas ciudades del mundo, representado tanto por sus edificios como por sus obras de arte o sus monumentos, está siendo sometido, desde hace tiempo, a amenazas muchas veces concretadas de degradación, deterioro y hasta destrucción. Es un fenómeno que afecta a urbes grandes o pequeñas, históricas o modernas.

Los materiales de construcción, a pesar de su aparente resistencia, son vulnerables a los agentes exteriores, y necesitan una protección eficaz contra la intemperie, contra los gases o vapores industriales e, inclusive, contra la acción de los microorganismos (Schuster et al., 1994). Dentro de lo que es necesario proteger están no

sólo el acero y la madera, sino también la mampostería. Sólo los frentes de edificios preparados con revoques o con materiales especiales quedan excluidos de este tipo de tratamiento. Conviene puntualizar que las pinturas, además de la función citada, actúan como factor decorativo, de gran importancia en la presentación final.

El desarrollo de los materiales aplicados en la construcción e industria ha dado un gran impulso para la resolución de muchos problemas de conservación y preservación del patrimonio. Sin embargo, para desarrollar técnicas de intervención es necesario conocer previamente la patología.

Una vez analizados los distintos ítems de patología, resulta necesario desarrollar el tema de las terapias que se sugieren al nivel de la experiencia con apoyo de la documentación y el intercambio con distintas fuentes de especialistas.

La utilización de materiales para la limpieza, reparación y protección de superficies se conoce desde la antigüedad, habiéndose empleado colas, adhesivos, impermeabilizantes, limpiadores, etc. ya sea de tipo orgánico o mineral y de origen natural o artificial (Giúdice y Benítez, 1998). En este último caso, los productos de síntesis se han diversificado significativamente, lo cual amplía la gama de materiales disponibles.

Los principales requisitos que deben cumplir estas pinturas son: color y retención del color, aspecto y brillo de la superficie pintada, adhesión, opacidad y resistencia al agua. Además, una pintura para exteriores debe mantener una buena apariencia a través de su uso durante un período prudencial (aproximadamente 5 años), dar adecuada protección a la superficie y, fundamentalmente proporcionar una base satisfactoria para las operaciones de repintado, sin que sea necesario en cada oportunidad eliminar completamente la película original (Xing et al., 1999).

Para cumplir con el primero de estos requisitos es necesaria una buena resistencia al tizado, a la decoloración y al desarrollo de microorganismos, principalmente hongos. En caso de aparecer tizado, es decir desintegración del filme debido al ataque del vehículo por acción de la luz ultravioleta, el mismo sólo podrá tener lugar después de un plazo aceptable, y además no deberá ser excesivo, pues en ese caso afectaría notablemente las características de brillo y color.

Para dar adecuada protección las pinturas deberán ser, además, resistentes al cuarteado ("checking") y al agrietado ("cracking"). Estos son los defectos más graves que pueden aparecer en una película protectora, pues afectan la integridad de la misma y hacen necesaria la eliminación de la pintura vieja antes del repintado, lo que evidentemente encarece los costos de reparación. El cuarteado es la rotura superficial de la película de terminación; en cambio, el agrietamiento afecta a la



totalidad del sistema (pintura de terminación y capas de fondo), pudiendo llegar, en los casos de mayor gravedad a dejar al descubierto la superficie de base.

Un deterioro de esta naturaleza sólo puede ser evitado mediante el uso de productos de buena calidad, que cumplan con las exigencias de las especificaciones. El cuarteado y el agrietado pueden reproducirse aceleradamente en escala de laboratorio mediante la utilización de aparatos especiales denominados Weather-Ometers. El empleo de los mismos permite predecir en un tiempo relativamente breve, el comportamiento de un material en el exterior.

Las pinturas basadas en silicatos como material formador de película no tienen una marcada significación económica pero constituyen sistemas de protección con una larga tradición. Así, por ejemplo, los silicatos inorgánicos fueron usados por milenios debido a su gran durabilidad: la momificación llevada a cabo por los egipcios y los murales por los romanos involucraban pinturas formuladas con silicatos inorgánicos. Posteriormente, éstas fueron también empleadas para superficies exteriores como productos de alta calidad.

Por otra parte, las dispersiones poliméricas de base acuosa para mamposterías exteriores tienen comparativamente una breve historia; el rápido desarrollo de estas pinturas estuvo basado fundamentalmente en la investigación y desarrollo de materiales poliméricos en emulsión.

Las pinturas de base acuosa formuladas con silicatos (generalmente dos componentes) y las del tipo dispersión polimérica (un solo componente) presentan ventajas y desventajas comparativas. Los productos acuosos con silicatos inorgánicos modificados con resinas en emulsión para exteriores constituyen un objetivo de interés con el fin de aunar las propiedades características de cada material en pinturas de un solo componente.

Este artículo incluye algunas conclusiones alcanzadas en experiencias previas relacionadas con las variables de formulación, características de los diferentes componentes y comportamiento de las películas de pintura en ensayos de laboratorio.

### **Silicatos empleados como ligante**

Las pinturas basadas en silicatos se pueden clasificar según si el curado se lleva a cabo por reacción química o tratamiento térmico (silicatos inorgánicos) o por autocurado (silicatos inorgánicos y orgánicos). Dichas pinturas se comportan en forma diferente durante el secado y el curado (Giúdice, 1989).

El secado limita el uso de algunas de estas pinturas: las inorgánicas son de base acuosa y no pueden ser usadas a



temperaturas inferiores a 0°C porque se congelan; además no secan si la humedad es muy alta. En condiciones ambientales de 20°C y 70% de humedad relativa, las películas de 75 µm secan en menos de una hora.

Las basadas en silicatos orgánicos (generalmente de etilo) secan rápidamente sin que incidan en forma significativa la temperatura y la humedad (5 a 10 minutos), pero emplean como solvente mezclas de alcoholes, hidrocarburos aromáticos y glicoles, lo que las hace vulnerables desde un punto de vista ecológico y limita además su empleo, particularmente por las regulaciones vigentes en muchos países; por esta razón no son consideradas en este trabajo (el curado es químico, por reacción con el agua de la atmósfera y liberación de alcohol etílico).

El método de curado es muy diferente de acuerdo con el tipo de pintura; las basadas en silicatos inorgánicos del primer grupo curan por reacción con ciertos reactivos químicos, los que son aplicados a la película seca (por ejemplo solución de ácido fosfórico o de fosfatos orgánicos, con agregado de agentes humectantes y controladores de reacción en pinturas ricas en cinc para facilitar su oxidación y permitir el intercambio del ion alcalino del silicato para causar insolubilidad). El tiempo de curado depende fuertemente de la temperatura; así, por ejemplo, éste no se lleva a cabo a 0°C, demorando entre 10 y 36 horas para temperaturas comprendidas entre los 5 y 30°C. El tratamiento exclusivamente térmico para convertir la película en insoluble en agua está vinculado al horneado de la película y puede aplicarse consecuentemente sólo a pequeñas piezas. La temperatura y el tiempo de curado dependen de la formulación: algunos valores oscilan entre 120 y 200°C durante 1 ó 2 horas.

En los últimos años se han formulado pinturas acuosas a base de silicatos del tipo autocurado, es decir productos que por sus características no requieren el empleo de tratamientos especiales después de su aplicación. Los mismos están basados en la utilización de silicatos de mayor relación sílice/álcali que los usados en las formulaciones iniciales. Estas pinturas curan por la acción del CO<sub>2</sub> del aire y por reacciones químicas internas complejas que incluyen la silicificación reticulada del material formador de película con los pigmentos y eventualmente con el sustrato. La temperatura igualmente influye en forma marcada: no cura a 0°C; involucra 7 días a 5°C; 1 a 3 días a 20°C y aproximadamente un día a 30°C.

Los silicatos inorgánicos solubles en agua generalmente se preparan partiendo de arena silícica fundida y un carbonato alcalino, disolviendo luego esta mezcla en agua. Las primeras composiciones incluyeron silicato de sodio, pero actualmente se recomienda el silicato de potasio ya que las pinturas formuladas con este último no desarrollan la eflorescencia blanca característica del carbonato de sodio, tienen

menor alcalinidad y presentan mayor resistencia al agua. La eficiencia en pinturas autocuradas aumenta con la relación sílice/álcali tanto en formulaciones con silicato de sodio o con silicato de potasio solos o bien mezclados entre sí. Las mejores relaciones molares  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  y  $\text{SiO}_2/\text{K}_2\text{O}$  oscilan entre 3,6/1 y 4,0/1, mientras que la relación en peso de sólidos entre ambos silicatos es aproximadamente 1. Los sólidos porcentuales en peso de las soluciones de silicatos inorgánicos alcalinos están generalmente comprendidos entre 30 y 35%, dependiendo de la relación sílice/álcali.

Las soluciones de silicato de litio producen vehículos estables, preparándose con una significativamente mayor relación  $\text{SiO}_2/\text{álcali}$  (6,0/1 a 8,0/1). Las pinturas basadas en estos silicatos generan por autocurado películas de elevada resistencia a la abrasión y durabilidad al exterior; sin embargo, su costo elevado ha limitado su empleo en escala comercial.

Las pinturas que incluyen silicatos inorgánicos que secan por evaporación del agua y que curan por la acción del  $\text{CO}_2$  del aire (el proceso de formación de la película es químico y no físico) presentan obviamente ventajas comparativas con las anteriores y son las que actualmente en forma gradual registran una mayor aceptación en el mercado (Lohmann, 1988; Rieber et al., 1988; Thies, 1988; Wilms, 1988).

Las ventajas generales, en forma comparativa, que presentan las pinturas basadas en ligantes con silicatos inorgánicos con respecto a aquéllas que incluyen resinas en su composición son la excelente resistencia a la exposición a la luz (particularmente la fracción ultravioleta) y al agua, lo cual le confiere una larga vida en servicio; así, por ejemplo, en exposiciones a la intemperie durante años, no se observa tizado de la película por degradación del ligante manteniendo los altos valores iniciales de resistencia a la abrasión.

Otra ventaja significativa de la silicificación reticulada es que conduce a la formación de películas de poro abierto, lo cual permite al vapor de agua difundir fácilmente a través de la misma; esto último previene la formación de ampollas y posterior desprendimiento de la película. Por lo tanto, se puede aseverar que las pinturas basadas en silicatos inorgánicos son eficientes para la conservación y preservación de monumentos, estructuras históricas y edificios arquitectónicos en los cuales la humedad acumulada en la interfase sustrato/película (superficies metálicas) o bien en el propio sustrato absorbente puede disiparse como vapor hacia el exterior sin afectar la adhesión.

Sin embargo, estas películas de poro abierto presentan elevados coeficientes de absorción de agua, lo que significa que el agua líquida puede penetrar a través de la película muy fácilmente en sustratos



porosos; esta reducida capacidad protectora constituye la mayor desventaja de las películas curadas basadas en silicatos inorgánicos.

En lo referente a la adhesión de la película y debido al propio proceso de curado, generalmente se observan altos valores en sustratos adecuadamente preparados, particularmente en superficies de hierro y acero con los que se registra una fuerte interacción química. Sin embargo, en sustratos porosos (mampostería, cemento, etc.) se detecta otra importante desventaja cuando los mismos están contaminados por el medio (grasas, aceites, hollín, etc.) ya que la adhesión de la película es generalmente pobre.

Otra desventaja, asociada a la aplicación de la pintura, es que ésta generalmente se provee en dos envases: uno contiene los pigmentos y el segundo, los restantes componentes. Ellos deben mezclarse previo a su empleo, durante un lapso habitualmente prolongado (en algunos casos 24 horas) según las indicaciones del fabricante, ya que se comportan mejor que los mismos productos aplicados inmediatamente después de su preparación; exhiben además un corto tiempo de vida útil de la mezcla, lo cual condiciona la cantidad a preparar, debido al incremento de viscosidad e inclusive solidificación por reacciones químicas entre los pigmentos y los silicatos alcalinos. La edad de la pintura preparada es una variable de significación.

Finalmente, la aplicación de pinturas basadas en silicatos inorgánicos puede realizarse con pincel, rodillo e inclusive con sopletes con o sin aire comprimido, ya que el desarrollo de los materiales permite la fabricación de estos últimos equipos resistentes al desgaste abrasivo.

## **Dispersiones poliméricas como material formador de película**

Las características de ciertos polímeros (compuestos de elevado peso molecular, formados por adición de moléculas sencillas unitarias denominadas monómeros) hacen imposible su utilización como sustancias formadoras de película por disolución (Dörr y Holzinger, 1990).

La diferencia fundamental entre un látex y una emulsión reside en el hecho de que el primero es el resultado de la dispersión de un sólido resinoso en agua, mientras que la emulsión es una dispersión de un líquido insoluble en otro. Esta diferencia estructural de la película trae como consecuencia una mayor resistencia al agua de las pinturas al látex con respecto a las pinturas emulsionadas, hecho éste que ha motivado su rápida popularización.

El vehículo de las pinturas al látex se obtiene por polimerización en emulsión de monómeros no saturados y se presenta comercialmente

como sistema estable, coloidal, de aspecto lechoso; el pigmento se encuentra disperso en la fase acuosa.

Las dispersiones poliméricas en agua incluyen diámetros de partículas que oscilan generalmente entre 0,1 a 5,0  $\mu\text{m}$ ; estas partículas usualmente son esféricas y sólidas o muy viscosas. Los sistemas de dispersión fina abarcan diámetros de 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$ , la mediana hasta 2,0  $\mu\text{m}$  y la gruesa hasta 5,0  $\mu\text{m}$ , existiendo algunas veces poca y en otras mucha diferencia de tamaño (homogéneos y heterogéneos, respectivamente). El contenido de sólidos se encuentra comprendido entre 45 y 65%, siendo el valor más frecuente el de 50% en peso. La estabilidad de las dispersiones poliméricas se logra empleando coloides protectores.

Las dispersiones poliméricas generalmente están compuestas por varios polímeros. La selección de los monómeros, el mecanismo de plastificación (interno o externo), las condiciones de elaboración y el tipo de coloide protector son importantes variables que definen las propiedades finales de la dispersión polimérica: viscosidad, temperatura mínima de formación de película, resistencia a la saponificación, comportamiento a la intemperie, estabilidad en el envase, diámetro medio y distribución de tamaño de la partícula polimérica y además capacidad ligante de las partículas del pigmento.

Las dispersiones poliméricas más importantes incluyen resinas sintéticas, tales como polímeros de acetato de vinilo, estireno, propionato de vinilo y derivados del ácido acrílico.

El mecanismo de formación de película de pinturas formuladas con dispersiones poliméricas es muy complejo y además totalmente diferente del que presentan los sistemas de base solvente. Luego de finalizada la aplicación de la película, las partículas del polímero se mueven libremente y prácticamente no están en contacto entre sí; durante el secado, producido por evaporación del agua de la superficie de la película y por absorción del sustrato si éste resulta poroso, las distancias interparticulares disminuyen. Las fuerzas capilares crecientes generadas por la tensión superficial (meniscos de agua más cóncavos entre las partículas ubicadas a menor distancia por la pérdida de agua) conducen a una significativa contracción de la película; a medida que este proceso avanza se produce la transición al estado de aglomeración de mayor densidad. Las partículas prácticamente no pueden moverse, las fuerzas capilares son elevadas y superiores a las fuerzas de repulsión: las partículas poliméricas, ayudadas por la presencia de agentes coalescentes (Perera et al., 2001) se sueldan entre sí a temperatura ambiente y por deformación llenan completamente todos los intersticios; como consecuencia se forma una superficie no totalmente lisa.



El estado de equilibrio final antes descripto generalmente se alcanza luego de varios días, dependiendo de la formulación y las condiciones ambientales. Para una correcta formación de película, la temperatura del medio debe ser superior a la temperatura de transición vítrea  $T_g$  del sistema (El-Aesser et al., 2001)(el  $T_g$  de la resina aumenta con la incorporación del pigmento), ya que por debajo de ese valor el polímero se encuentra en estado vítreo y en consecuencia la coalescencia no es posible. En general los polímeros duros tienen un  $T_g$  alto mientras que los blandos un valor inferior; la copolimerización de monómeros duros y blandos permite ajustar el  $T_g$  según cada requerimiento en particular.

La experiencia indica que con un valor de  $T_g$  inferior a  $5^\circ\text{C}$  no se necesita agente coalescente para la formación de la película; sin embargo, sus propiedades mecánicas luego del secado/curado (resistencia a la abrasión húmeda y lavabilidad particularmente) disminuyen en forma inaceptable, lo que obliga al empleo de mayores contenidos porcentuales de resina en la pintura con el consiguiente incremento de costos.

Consecuentemente, con resinas de  $T_g$  superior a  $5^\circ\text{C}$  se requiere, para formar una película homogénea, una plastificación exterior (adición de agentes coalescentes); los productos no volátiles permanecen en la película y disminuyen las propiedades mecánicas mientras que los disolventes de punto de ebullición elevado presentan una acción coalescente eficiente y transitoria: la partícula del polímero lo absorbe produciendo una disolución superficial que favorece la fusión en frío y finalmente se evapora. El tipo y contenido de agente coalescente se deben determinar en ensayos de laboratorio.

El mecanismo físico de formación de película de pinturas al látex conduce, como se mencionara, a sistemas compactos y generalmente de muy baja permeabilidad al vapor de agua. El proceso difusional es lento y el agua acumulada a través del tiempo en la interfase sustrato/película o bien absorbida por el sustrato previo a la aplicación de la pintura o ya en servicio puede generar ampollamiento por no poder disiparla adecuadamente en forma de vapor. Esto constituye la principal desventaja comparativa de las pinturas basadas en la dispersión acuosa de polímeros conjuntamente con la reducida resistencia a la luz solar por la degradación de sus componentes orgánicos.

Sin embargo, y dado que usualmente se evalúa también la capacidad de protección del sustrato en términos de absorción de agua, las pinturas al látex presentan coeficientes muy bajos y a la vez menores que las pinturas formuladas con silicatos alcalinos; este efecto protector resulta una de las principales ventajas que exhibe este tipo de pinturas.

## Formulación de pinturas basadas en silicatos alcalinos y dispersiones poliméricas

Los más importantes componentes de estas pinturas son los silicatos inorgánicos solubles en agua, los polímeros en dispersión acuosa, el pigmento que confiere poder cubriente, los extendedores y los aditivos. Una formulación y líneas generales de la manufactura se observan en la Tabla I.

La solución de  $\text{SiO}_2/\text{K}_2\text{O}$  (relación desde 3,5/1 a 4,0/1, con un nivel de sólidos en peso de aproximadamente 30%, densidad de sólidos  $1,85 \text{ g/cm}^3$ ) resulta, como ya se mencionara, eficiente como material inorgánico formador de película. Seleccionar un silicato alcalino adecuado es muy importante ya que exhibe una significativa influencia sobre la resistencia al tizado de la película en servicio.

**Tabla I**

Formulación base de una pintura acuosa basada en un silicato alcalino, modificada con una resina acrílica estirenada en emulsión

Componentes	% en peso	Condiciones operativas*
Agua	20,0	Baja velocidad (aprox.700 rpm)
Antiespuma	0,2	
Aditivos reológicos	0,6	
Preservadores (fungicida, etc.)	0,4	
Agente dispersante	0,2	Baja velocidad (aprox.700 rpm)
Agente estabilizante	0,3	
Silicato alcalino (solución 30 %)	0,5	
Dióxido de titanio	10,0	Dispersión hasta el grado deseado, a alta velocidad (aprox.1500 rpm)
Extendedores	30,0	
Aguarrás	0,7	Baja velocidad (aprox.700 rpm)
Resina acrílica estirenada (emulsión 50 %)	9,0	
Silicato alcalino (solución 30 %)	23,5	
Antiespuma	0,2	
Aditivo hidrofóbico (resistencia al agua)	0,3	
Agua	4,1	

\* Dispensor de disco de alta velocidad (Dissolver)

Los silicatos alcalinos tienen en solución un elevado valor de pH (generalmente superior a 12); este aspecto debe ser considerado en el momento de seleccionar los restantes componentes de la formulación,



los cuales deben ser resistentes a la saponificación. Particularmente las dispersiones poliméricas no deben alterarse en ese medio para conferirle a la pintura sus propiedades características. Las resinas acrílicas estirenadas y las resinas acrílicas puras en dispersión acuosa (Schawartz et al., 1999) (generalmente 50% en peso de sólidos, densidad del polímero 1,10 g/cm<sup>3</sup>) son resistentes a la saponificación, prueba de esto es que las pinturas al látex basadas en ellas se aplican sobre cemento y hormigones con excelente comportamiento durante su vida útil; la temperatura de transición vítrea Tg debe estar comprendida entre 5 y 10°C, dependiendo de las condiciones ambientales. El aguarrás mineral puede ser empleado como coalescente ya que el mismo no reacciona con el silicato de potasio.

La Tabla I permite concluir que el silicato de sodio/resina acrílica estirenada están presentes en una relación volumétrica prácticamente 1/1 (más precisamente 3,9/4,1) lo cual indica que ambos formadores de película tienen considerable influencia sobre las propiedades finales.

El pigmento que otorga poder cubriente a la película debe ser preferentemente inorgánico, lo cual implica que los colores están más restringidos que en las pinturas al látex. El dióxido de titanio es habitualmente el seleccionado, aunque debe considerarse el tipo comercial que no presente un incremento de viscosidad en el envase por saponificación de la sustancia orgánica que reviste a las partículas para mejorar fundamentalmente su dispersión.

En lo referente a los extendedores, éstos presentan también una gran influencia sobre diferentes propiedades (comportamiento reológico, estabilidad en el envase, resistencia a la intemperie, etc.). El silicato de aluminio y el silicato de magnesio son muy eficientes, ya que intervendrían en la silicificación reticulada que produce el silicato alcalino formador de película por su afinidad química con estos extendedores; el carbonato de calcio genera películas con menor resistencia al tizado que los anteriores.

El PVC (concentración de pigmento en volumen) de estas pinturas está ubicado alrededor de 65%, dependiendo de la formulación; valores de PVC inferiores y particularmente superiores al citado anteriormente generan películas de reducidas propiedades y menor resistencia a la intemperie.

Los aditivos seleccionados deben igualmente ser resistentes a la saponificación para evitar el cambio de propiedades en el envase. Los agentes dispersantes y estabilizantes, los espesantes y modificadores reológicos, etc. preferentemente deben ser inorgánicos. Los preservadores (fungicidas y algicidas) deben ser eficientes en la película en servicio, en donde el pH es aproximadamente neutro debido a la silicificación durante el curado (preservadores para su acción en el envase no son requeridos ya que el pH fuertemente alcalino tiene un

marcado efecto protector) (Schawartz et al., 1999; Cornish, 1999; Pereira Leite y Murro, 1999; Mayer, 1999).

### **Propiedades de las pinturas modificadas a base de silicatos alcalinos en dispersiones poliméricas**

La formulación base de la Tabla I conduce a películas de pintura con valores de permeabilidad al vapor de agua y coeficiente de absorción de agua satisfactorios, alcanzando un grado de compromiso aceptable entre el comportamiento por separado de las pinturas basadas en silicato de potasio y en la dispersión de la resina acrílica estirina. Esto significa que ambos formadores de película, en la relación volumétrica indicada, conforman un sistema en el que la absorción de agua disminuye por la incorporación al silicato alcalino de la dispersión polimérica, pero manteniendo una película de poro abierto que permite disipar el vapor de agua.

Las propiedades físicas de la película preservan el carácter inorgánico intrínseco del silicato alcalino y el comportamiento propio de las dispersiones poliméricas. En resumen, las principales ventajas son las siguientes:

- Se elaboran en un solo envase, con una adecuada estabilidad (se prolonga la vida útil que exhibe la mezcla de dos componentes de la pintura inorgánica)
- Presentan elevada resistencia a la acción de los microorganismos en el envase, debido al pH fuertemente alcalino
- Pueden ser adelgazadas con agua, diluyente económico, no contaminante y no inflamable; todos los elementos y equipos involucrados pueden ser limpiados también con agua
- Son fáciles de aplicar con pincel, rodillo y soplete. Secan rápidamente por pérdida de agua. El olor desaparece más rápidamente que con los acabados tradicionales
- Exhiben mejor aspecto superficial sobre sustratos con zonas de diferente porosidad ya que el material formador de película no es absorbido por el mismo
- Muestran una adhesión a sustratos porosos contaminados fuertemente incrementada debido a la incorporación al ligante inorgánico de la resina dispersada



- Tienen una excelente resistencia a la luz solar, particularmente a la radiación ultravioleta (resistencia al tizado, cuarteado, agrietado, escamación, etc.) debido al ligante mineral de su composición
- Ofrecen una equilibrada resistencia al pasaje de vapor de agua que evita la formación de ampollas y posterior desprendimiento de la película
- Presentan buena lavabilidad y las manchas se eliminan fácilmente
- Son resistentes a los álcalis y por lo tanto pueden emplearse en la protección de concretos y revoques relativamente frescos

Finalmente, algunos inconvenientes relacionados con el uso de este tipo de pinturas deben ser mencionados explícitamente:

- Presentan un poder cubriente en general inferior al de las pinturas al látex
- Exhiben una difícil remoción de películas envejecidas debido a su buena resistencia a los álcalis y disolventes
- Pueden saponificar películas aplicadas basadas en dispersiones poliméricas o emulsiones; en estos casos el repintado debe contemplar la eliminación del esquema existente
- Se elaboraran con colores limitados, dado que los pigmentos deben ser preferentemente inorgánicos para evitar reacciones no deseadas en el envase

## BIBLIOGRAFÍA

- Canning Espósito, C. (2000) Preserving and Protecting. *Coatings World* **5** (8), 67.
- Cornish, A. (1999) The impact of the global environment on innovation in the biocide industry. *Proc. 6º Congresso Internacional de Tintas*, San Pablo, Brasil, Vol. II, 381.
- Dörr, H.; Holzinger, F. (1990) Formulación óptima de pinturas en emulsión. En: *Bióxido de titanio Kronos en pinturas en emulsión, (Kronos Titandioxid in Dispersionsfarben)*, Ed. Kronos International Inc., págs. 89-98.
- El-Aasser, M.S. et al. (2001) Advances in emulsion polymerization for coatings applications: latex blends and reactive surfactants. *Journal of Coatings Tech.* **73** (920), 51-64.

- Giúdice, C. (1989) Pinturas ricas en cinc basadas en silicatos inorgánicos y orgánicos. En: *Propiedades y Control de Calidad de Pinturas y Revestimientos*, Ed. Organización de Estados Americanos (OEA), Cap. 15, 179.
- Giúdice, C.; Benítez, J. (1998) Reparación de esculturas y monumentos. *Ingeniería y Ciencia Tecnológica* **1** (1), 24.
- Lohmann, W. (1988) Cariche idonee per P.V. ai silicati in dispersione. *Pitture e Vernici* **64** (6), 81-84.
- Mayer, H. (1999) The chemistry and properties of silicone resins. *Surface Coatings Internat.* **82** (2), 77.
- Perera, D.Y.; Vanden Eynde, D.; Borsus, J.M. (2001) Changes in composition and characteristics of latex paints applied on porous inorganic substrates. *Journal of Coatings Tech.* **73** (919) 89-93.
- Pereira Leite, L.; Murro, M. (1999) Nova tecnologia multifuncional para la proteção microbiológica de tintas en emulsão. *Proc. 6º Congresso Internacional de Tintas*, San Pablo, Brasil, Vol. I, 147-151.
- Rieber, W.; Droll, K.; Gettwert, G. (1988) Pitture ai silicati: formulazione, applicazione, caratteristiche. *Pitture e Vernici* **64** (6), 29-40.
- Schawartz, M.; Kossman, H.; Schweigger, E. (1999) Estudio comparativo de ligantes clásicos en dispersión a base de copolímeros acrílicos y acrílicos estirénicos para pinturas de fachada. *Proc. 6º Congresso Internacional de Tintas*, San Pablo, Brasil, Vol. I, 75-92.
- Schuster, P.; Reddy, M.; Sherwood, S. (1994) Effects of acid rain and sulfur dioxide on marble dissolution. *Mat. Performance* **33** (1), 76-80.
- Thies, U. (1988) Addensanti poliuretanici per pitture ai silicati. *Pitture e Vernici* **64** (6), 75-78.
- Wilms, A. (1988) Pigmentazione delle pitture a dispersione a base di silicato. *Pitture e Vernici* **64** (6), 45-51.
- Xing, L.; Glass, J.; Fernando, R. (1999) Parameters influencing the spray behavior of waterborne coatings. *J. Coatings Tech.* **71** (890), 37-50.

# OS FUNGOS COMO ORGANISMOS DETERIOGÊNICOS EM PRÉDIOS HISTÓRICOS CONSTRUÍDOS DE PEDRA

Christine C. Gaylarde

*Departamento de Biofísica/UFRGS, Porto Alegre, Brasil*

*e-mail: cgaylarde@yahoo.com*

## RESUMO

Os microrganismos envolvidos na biodeterioração de prédios são bactérias, fungos e algas, destes, destacam-se geralmente os fungos. Apresentam-se os fungos e suas atividades, envolvidos na deterioração e degradação de construções de pedra calcária e silicácea, bem como de superfícies pintadas. Foi sugerido que os fungos mitospóricos escuros são os mais importantes como deteriorogênicos fúngicos das superfícies rochosas. Tais fungos não são freqüentemente detectados utilizando técnicas padronizadas de plaqueamento, uma vez que eles crescem mais lentamente que fungos comuns como *Aspergillus* e *Penicillium*. Consideram-se as tendências recentes, tais como a influência de poluentes atmosféricos nos processos da formação de biofilmes nas superfícies de prédios e o uso de técnicas moleculares na detecção e identificação dos microrganismos presentes neste ambiente especial.

**Palavras chave:** *Fungos, biodeterioração, patrimonio cultural, biofilmes, materiais de construção*

## INTRODUÇÃO

Prédios modernos e antigos são sujeitos a intemperismo devido a fatores biológicos e não biológicos. Os fatores biológicos e, especialmente, microbiológicos, são mais importantes nos climas tropicais e subtropicais do que nos climas temperados. Vem crescendo recentemente o interesse na biodeterioração potencial dos prédios do patrimônio cultural em ambientes quentes e úmidos. No Brasil, destaquem-se projetos de pesquisa em biodeterioração das igrejas históricas de Minas Gerais e o uso de ensaios microbiológicos como rotina durante a restauração de vários monumentos históricos, como a estátua do Cristo Redentor no Rio de Janeiro. A Bíblia e uma das primeiras publicações sobre a natureza infecciosa da podridão em casas (Levítico XIV, 33-57) e esta citação indica a dificuldade do tratamento, cuja única solução poderia ser a reconstrução do prédio.

Os microrganismos envolvidos na biodeterioração são bactérias, fungos e algas, destes, destacam-se geralmente os fungos. São presentes nos gêneros fúngicos isolados das superfícies de



monumentos e fachadas de construções, muitos que são representativos da flora do ar e do solo (Perichet, 1987, Petersen et al., 1987, Grant et al., 1989, McCormack et al., 1996). Recentemente, foi sugerido que os fungos mitospóricos escuros são os mais importantes como deteriorogênicos fúngicos das superfícies rochosas (Sterflinger & Krumbein, 1997; Urzi et al., 1999). Tais fungos não são frequentemente detectados utilizando técnicas padronizadas de plaqueamento, uma vez que eles crescem mais lentamente que fungos comuns como *Aspergillus* e *Penicillium*.

A colonização e biodeterioração dos prédios são determinadas pelas condições ambientais (temperatura, umidade, velocidade do vento e intensidade de luz) e pelo tipo do material. As rochas comumente utilizadas na construção de prédios históricos são silicáceas ou calcáreas (Tabela 1), embora existe uma variação entre os dois tipos (Figura 1). A colonização da superfície e a degradação estrutural conseqüente se influenciam pela porosidade e permeabilidade do material, o pH e a natureza química da superfície.

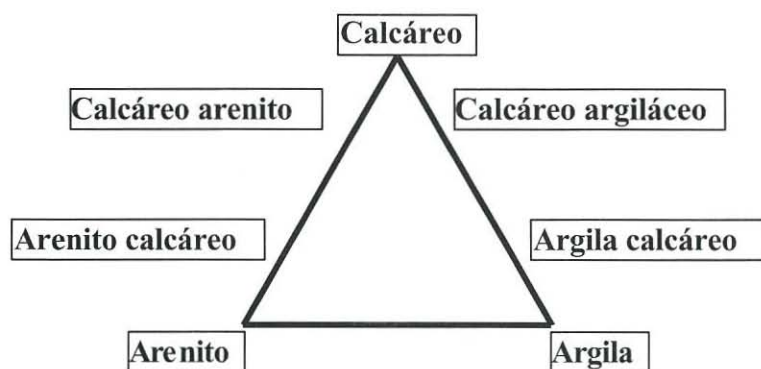
**TABELA 1**

Rochas utilizadas como materiais de construção na antigüidade na América Latina (AL)

<b>Tipo da rocha</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Porosidade (%)</b>	<b>Outras características relevantes</b>	<b>Prédios históricos (exemplos)</b>
Silicáceo	Quartzito	1-2	Muito duro, ácido	Igrejas do MG.
	Granito/Gneiss	1	Duro, ácido	Cristo Redentor, Rio, Brasil; Machu Picchu, Peru.
	Arenito	5-30	Durabilidade variável, ácido	Igrejas do MG; catedral do Cuzco, Peru.
	Pedra sabão	0,5-5	Macio, básico, resistente a ácidos	Igrejas do MG; Cristo Redentor, Rio, Brasil.
	Basalto	0,5-5	Básico	Quilmes, Argentina; Sillustani, Peru.
	Ardósia	0,5-5	Básico	Quilmes, Argentina; Prédios coloniais na AL.
Calcareo	Calcáreo	2-20	Básico	Construções Maías da península Yucatán, México; prédios coloniais, Cartagena, Colombia.
	Mármore	0,5-2	Básico	Igrejas do MG.

MG = Estado do Minas Gerais, Brasil

A superfície das construções é modificada por poluentes químicos tais como hidrocarbonetos, os quais podem atuar como nutrientes para fungos (e outros microrganismos), levando a danos mais intensos (Saiz-Jimenez, 1995, 1997; Zanardini et al., 2000). Revestimentos também modificam as características das superfícies, tintas e vernizes impedem o ingresso de água e poderiam ser protetores. Entretanto, eles também reduzem a saída da umidade, acelerando assim a degradação das camadas internas da pedra. Superfícies pintadas poderiam ser sujas pelo crescimento de fungos e algas e atividades fúngicas podem levar a descolamento do filme. Os microrganismos podem solubilizar as pedras pelo seu metabolismo e os íons liberados podem ser absorvidos como nutrientes. As pedras podem ser degradadas pelos ácidos orgânicos produzidos pelos fungos (Petersen et al., 1987, Williams & Rudolph, 1974, Krumbein & Petersen, 1974) e por outros metabólitos, como os sideróforos, os quais podem produzir microfaturas na superfície (Krumbein & Schonburn-Krumbein, 1987).



**Figura 1:** Relacionamento entre rochas calcárias, arenáceas e argiláceas

## AS SUPERFÍCIES DAS PEDRAS

A biodeterioração da pedra é produzida pelas atividades de organismos superficiais (epilíticos) e aqueles que crescem dentro da rocha (os endolíticos). Os organismos obtêm cálcio, alumínio, silício, ferro e potássio do substrato através da bio-solubilização, utilizando vários ácidos orgânicos e inorgânicos que são liberados das células. Os ácidos atacam e degradam materiais calcários pela dissolução dos íons de cálcio e levam finalmente a formação dos produtos da degradação como gesso, calcita, glauconita, dolomita, etringita e quartzo (Ascaso,

1982). Os organismos colonizadores devem sobreviver em condições secas e de alta temperatura e iluminação. Muitos fungos são bem adaptados a estas condições. Os fungos também podem alterar a permeabilidade a água dos materiais pela deposição de materiais poliméricos e surfactantes. O transporte da água pode ser aumentado ou reduzido, dependendo da natureza dos depósitos, e pode levar a dissolução localizada ou a deposição de sais (Dukes, 1972). Todas os grupos taxonômicos de fungos tem capacidade de precipitar o oxalato de cálcio, que leva ao aumento da pressão dentro da rocha (Sterflinger, 2000). O resultado final destes processos é freqüentemente a falha catastrófica da camada superficial, conhecida em inglês como "spalling".

### **Pedras silíceas**

Os fungos, juntamente com os microrganismos fotossintéticos, formam crostas de má aparência nas construções de pedra silíceas (Figs. 2, 3).



**Figura 1:** Biofilmes (crostas) na parede externa da Igreja de São Francisco, Ouro Preto, Brasil.





**Figura 2:** ICHS, Universidade de Ouro Preto (antigo Seminário Menor da N.ª S.ª da Assunção), Brasil.

Os fungos tem a capacidade de solubilizar sílica e são agentes importantes na degradação de sílicas e aluminosílicas rochosas. Os mecanismos da solubilização incluem:

1. Quelação. Gluconato, por exemplo, pode quelar os componentes catiônicos da sílica, nesta maneira solubiliza caolinito, e também pode solubilizar quartzo nos valores neutros do pH (Vandevivere et al., 1994). Ácidos orgânicos produzidos durante o metabolismo fúngico podem solubilizar quartzo pela formação de um complexo, processo que é mais rápido em condições neutras que ácidas (Bennett et al., 1988).
2. Degradação por ácidos. Muitos fungos produzem ácidos inorgânicos e orgânicos que solubilizam minerais silicáceos. Walch & Ullman (1993) mostraram que ácidos orgânicos são mais efetivos que ácido clorídrico e ácido nítrico na solubilização de feldspato.

3. Reação com polissacarídeos extracelulares. Os polímeros extracelulares liberados pelos fungos reagem com siloxanos para formar siloxanos orgânicos, que são mais solúveis (Holzapfel & Engel, 1954, Avakyan et al., 1986). Segundo os autores a reação poderia ser dependente do pH, sendo favorecida em condições ácidas (Walch & Vandevivere, 1995). Os polissacarídeos na superfície de um material mineral podem também levar ao aumento do tempo da permanência de água, facilitando as reações químicas que caracterizam a degradação da sílica em temperaturas baixas (Barker et al., 1997).
4. Despolimerização de polisilicatos (siloxanos, metasilicatos).
5. Sob condições secas, como encontram-se freqüentemente nas superfícies expostas de construções, muitos microrganismos produzem protetores contra a dessecação. São poliols, tais como glicerol e manitol nos fungos (Hocking, 1993). Os poliols causam a expansão do mineral micáceo pela intercalação entre os planos de polisiloxanos dos cristais da mica. A expansão induz estresse na rocha, levando a biodegradação física e “spalling”, e poderia aumentar acesso de ácidos e agentes quelantes aos íons dentro dos cristais. Os poliols também podem reagir diretamente com grupos silano na periferia dos cristais, solubilizando o silício.

A colonização fúngica em qualquer tipo de pedra também acompanha a formação de líquens, que têm seus próprios efeitos degradadores.

A maioria dos monumentos históricos no Brasil são construídos de pedra silicosa. Resende et al. (1996) identificaram uma faixa ampla de fungos filamentosos em pedra sabão e quartzito no Estado do Minas Gerais. Os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* foram os mais comuns, entretanto, como já foi comentado, as técnicas de detecção utilizadas podem afetar os gêneros identificados. Sterflinger (2000) destaca *Aspergillus niger*, *Penicillium simplissimum* e *Scopulariopsis brevicaulis* como gêneros fúngicos importantes que atacam silicatos e salienta que os “fungos pretos” podem produzir pites de até 2cm de diâmetro nas superfícies rochosas.

## **Pedra calcárea**

Pode ser biodegradada por ácidos fúngicos (Koestler et al., 1985, Grant, 1982, May et al., 1993) e pela penetração mecânica dos filamentos (Hoffmann, 1989, Ortega-Calvo et al., 1991). Os microrganismos são classificados de acordo com o seu tipo de



crescimento em organismos epilíticos e endolíticos, i.e., que crescem na superfície ou dentro da pedra, respetivamente. A biodeterioração estética se produz pelas colorações superficiais que ocorrem na colonização fúngica epilítica ou endolítica (Fig. 3). Sem dúvida, os fungos são agentes importantes na biodeterioração estética de monumentos calcáreos. Os fungos melanóticos e os actinomicetos, bem como as cianobactérias com células ou cápsulas escuras, estão freqüentemente presentes nas construções calcáreas (Ortega-Morales, 2000, Letznicka et al., 1988). Este crescimento é a causa comum das colorações variáveis das superfícies de construções de pedra.

Os fungos foram associados com a degradação mecânica do calcáreo (Lepidi & Schippa, 1973, Bassi et al., 1984) e muitos fungos isolados de prédios da pedra foram mostrados produzir ácidos, os quais poderiam degradar calcáreo (Griffin et al., 1991, Henderson & Duff, 1963, Weed et al., 1969, Resende et al., 1996, Gaylarde et al., 2000). Como um exemplo, cita-se Videla et al. (2000), que isolaram um fungo mitospórico escuro de prédios calcários no Uxmal, na península Yucatán, Mexico. O fungo reduziu o pH inicial de 7,0 num meio de glicose/sais minerais a 3,0 a 4,0. Vários fungos foram mostrados capazes de solubilizar pedra através da produção de ácidos orgânicos (Webley et al., 1963, Eckhardt, 1985a,b, Kanatchinova & Kasymbekov, 1986). Fungos mitospóricos escuros podem também penetrar ativamente em mármore e calcáreo, produzindo "biopites" (Gorbushina et al., 1994; Sterflinger & Krumbein, 1997) e estes mostraram-se especialmente importante nos ambientes áridos e semi-áridos (desertos quentes e frios) devido a sua capacidade de resistir temperaturas altas, dessecação e estresse osmótico (Sterflinger, 1998).

## SUPERFÍCIES PINTADAS

Os fungos são responsáveis para a sujeira e descolamento em superfícies pintadas. Os principais gêneros detectados em construções modernos e históricos são *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Epicoccum* e contaminantes comuns do ar como *Penicillium* e *Aspergillus* (Springle, 1996; Crippa, 1983; Turner, 1967; Ross et al., 1968). A pintura geralmente contém material orgânico que torna-se apropriada a crescimento fúngico, mesmo sem outros contaminantes. O problema principal é a coloração de pinturas claras (Figs. 4, 5). Normalmente, estas ficam de cores cinza, preta ou marrom, mas a cor varia com a cor dos esporos fúngicos e as condições ambientais, que afetam a produção dos esporos e do pigmento. Vários fungos, como o gênero *Aureobasidium*, são capazes de degradar a pintura, levando a destruição e descolamento da superfície.



## TENDÊNCIAS RECENTES

No mundo moderno, os níveis altos dos particulados na atmosfera, especificamente aqueles da fumaça produzida da queima de combustíveis fósseis, sujam as superfícies dos prédios pela adsorção (Gauri, 1978). O aumento aparente na taxa da degradação de pedras em locais urbanizados desde o final do século XIX foi discutido por Winkler (1976). Foi sugerido que os poluentes orgânicos adsorvidos poderiam atuar como fontes de nutrientes para o crescimento de microrganismos heterotróficos (bactérias e fungos), acelerando assim os processos de deterioração estética e físico-química (May et al., 1993, Saiz-Jimenez, 1995, Young, 1996). Os poluentes adsorvidos são uma mistura diversa de materiais orgânicos, incluindo ácidos graxos e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Saiz-Jimenez, 1995), obviamente estes modificam a natureza da superfície da pedra e permitem o crescimento dos organismos heterotróficos.

A literatura sugere que os fungos estão presentes em baixos números nas superfícies das construções históricas de pedra. Populações de  $10^2$ - $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> pedra são comuns (Resende et al., 1992; Urzi, 1993, Gaylarde et al., 2000, Ortega-Morales, 2000). Sugerem-se que as algas contribuem a degradação fúngica da pedra pela contribuição de substratos orgânicos para a produção de metabólitos fúngicos ácidos (Koestler et al., 1985, Gómez-Alarcón et al., 1994). Poderia ser a atividade fúngica e não os números que é o parâmetro importante. Uma outra explicação pode ser os métodos de detecção utilizados; fungos que crescem lentamente, que são considerados muito importantes na deterioração da pedra, não aparecem nas placas pois estas estão totalmente tomadas pelo crescimento de fungos de menor impacto que crescem mais rapidamente, tais como *Aspergillus* and *Penicillium* (Wollenzien et al., 1995). Entretanto, nossos conhecimentos das populações bacterianas nas superfícies de construções de pedra estão sendo modificados pelo uso de técnicas de biologia molecular, o qual permite a identificação de microrganismos não cultiváveis (Ward et al., 1990, Muyzer et al., 1996). Membros da família *Archaea* e muitos actinomicetos foram detectados em pinturas murais degradadas na Europa (Rolleke et al., 1996; Gurtner et al., 2000) e as mesmas técnicas sugerem que a maioria de bactérias heterotróficas colonizadoras de rochas e monumentos são actinomicetos, principalmente similar ao gênero *Geodermatophilus* (Eppard et al., 1996, Daffonchio et al., 1999). A utilização de tais métodos para detectar as populações fúngicas ainda é pouca, mas sem dúvida vai revolucionar nossos conhecimentos dos fungos deteriorogênicos em prédios históricos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascaso, C., Galvan, J., Rodriguez-Pascual, C. (1982) *Pedobiologia* **24**, 219-229.
- Avakyan, Z.A., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I. (1986) *Mikrobiologiya* **55**, 369-374.
- Barker, W.W., Walch, S.A., Banfield, J.F. (1997) En: *Gemicrobiology, interactions between microbes and minerals*, J.F. Banfield, K.H. Nealson, (eds.), Mineralogical Soc. of Am., Washington DC, 267-307.
- Bassi, M., Barbieri, N., Bonechchi, R. (1984) *Arte Lombarda* **68/69**, 117-121.
- Bennett, P.C. et al. (1988) *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**, 1521-1530.
- Crippa, A. (1983) *Atta della Soc. Italiana di Scienza Naturali e del Museo Civico do Storia Naturale di Milano* **124**, 2-10.
- Daffonchio, D. et al. (1999) *Internat. Biodet. Biodeg.* **44**, 161.
- Dukes, W.H. (1972) *The Architects' Journal*, **156**, 433-438.
- Eckhardt, F.E.W. (1985a) En: *Proc. 5th Internat. Cong. Deterioration & Conservation of Stone*, vol. 2, G. Felix (ed.), Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 643-652.
- Eckhardt, F.E.W. (1985b) En: *The Chemistry of Weathering*, J.I. Drever (ed.), Reidel Publ. Co., Dordrecht, 161-173.
- Eppard, M. et al. (1996) *Arch. Microbiol.* **166**, 12-22.
- Gauri, K.L. (1978) *Sci. Am.* **238**, 104-110.
- Gaylarde, P.M. et al. (2000) *Biofouling* (en prensa).
- Gómez-Alarcón, G., Flores, M. (1994) *Internat. Biodet. Biodeg.* **34**, 169-180.
- Gorbushina, A.A. et al. (1994) *Geomicrobiol. J.* **11**, 205-211.
- Grant, C. (1982) *Internat. Biodet. Bull.* **18**, 57-65.
- Grant, C. et al. (1989) *Internat. Biodet.* **25**, 259-284.
- Griffin, P.S., Indictor, N., Koestler, R.J. (1991) *Internat. Biodet.* **28**, 187-207.
- Gurtner, C. et al. (2000) *Internat. Biodet. Biodeg.* **46**, 229-239.
- Henderson, M.E.K., Duff, R.B. (1963) *J. Soil Sci.* **14**, 236-246.
- Hocking, A.D. (1993) En: *Stress Tolerance of Fungi*. D.H. Jennings (ed.), Marcel Dekker Inc., N.Y., 233-256.
- Hoffmann, L. (1989) *The Bot. Rev.* **55**, 77-105.
- Holzappel, L., Engel, W. (1954) *Z. Naturforsch.* **9b**, 602-606.
- Kanatchinova, M.K., Kasymbekov, B.K. (1986) *Mikrobiol. Fitopatol.* **20**, 47-52.

- Koestler, R.J. et al. (1985) En: *Vth International. Congress in Deterioration & Conservation of Stone*, Vol. 2, G. Felix (ed.), Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 617-626.
- Krumbein, W.E., Petersen, K. (1987) *Bautenschultz/Bausanierung. Sonderheft.* 61-64.
- Krumbein, W.E., Schonburn-Krumbein, C.E. (1987) *Bautenschultz/Bausanierung.* 1, 14-23.
- Lepidi, A.A., Schippa, G. (1973) En: *1st Internat. Symp. on Deterioration of Building Stones*, V. Romanowski (ed.), Les Imprimeries Reunies de Chambéry, Chambéry, 143-148.
- Letznicka, S., Strzelczyk, A., Wandrychowska, D. (1988) En: *6th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Nicholas Copernicus University, Torun, 102-110.
- McCormack, K. et al. In *Labs 2, Biodegradation and Biodeterioration in Latin America*. Gaylarde, C.C., Enilson L, Saccol de Sá., Gaylarde, P. (eds.), MIRCEN, UNEP/UNESCO ICRO - FEPAGRO/UFRGS, Brazil, 1996, pp. 68 - 69.
- May, E. et al. (1993) *Biodet. Abs.* 7, 109-123.
- Muyzer, G. et al. (1996) En: *Molecular Microbial Ecology Manual*, A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3.4.4.1-3.4.4.22.
- Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, H., Saiz-Jimenez, C. (1991) *Internat. Biodet.* 28, 165-186.
- Ortega-Morales, O. et al. (2000) *Curr. Microbiol.* 40, 81-85.
- Perichet, A. (1987) En: *Biodeterioration of constructional materials*. Morton, L.H.G. (ed.), Biodeterioration Society, 103-112.
- Petersen, K. et al. (1987) En: *Biodeterioration 7.* Houghton, D. R., Smith, R. N. and Eggins, H.O.W. (eds.), Elsevier Science Ltd. London, 123-128.
- Resende, M.A. et al. (1992) En: *First LABS, Latin American Biodeterioration Symposium*, Latorre WC and Gaylarde CC, eds., TecArt Editora São Paulo, 17-22.
- Resende, M.A. et al. (1966) En: *Biodegradation & Biodeterioration in Latin America*, C.C. Gaylarde, E.L.S. de Sá, P.M. Gaylarde (eds.), Mircen/UNEP/UNESCO/ICRO-FEPAGRO/UFRGS, Porto Alegre, 65-67.
- Rolleke, S. et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2059-2065.
- Ross, R.T., Sladen, J.B., Wienert, L.A. (1968) En: *Biodeterioration of Materials*, Walters, A.H. and Elphick, J.S. (eds.), Elsevier, London, 317-325.
- Saiz-Jimenez, C. (1995) *Aerobiologia* 11, 161-175.
- Saiz-Jimenez, C. (1997) *Internat. Biodet. Biodeg.* 40, 225-232.



- Springle, R. (1996) En: *Labs 2, Biodegradation and Biodeterioration in Latin America*. Gaylarde, C.C., Enilson L, Saccol de Sá., Gaylarde, P. (eds.), MIRCEN, UNEP/UNESCO ICRO - FEPAGRO/UFRGS, Brazil, 47 -50.
- Sterflinger, K. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**, 271-281 (1998).
- Sterflinger, K. (2000) *Geomicrobiol. J.* **17**, 97-124.
- Sterflinger, K., Krumbein, W.E. (1997) *Geomicrobiol. J.* **14**, 219-230.
- Turner, J.N. (1967) *The Microbiology of Fabricated Materials*, 248-268.
- Urzi, C. et al. (1999) *Geomicrobiol. J.* **16**, 39-54.
- Urzi, C. (1993) En: *Trends in Microbial Ecology*, R. Guerrero & C. Pedos-Alio (eds.), Spanish Soc. for Microbiol., Madrid, 667-672.
- Vandevivere, P. et al. (1994) *Microb. Ecol.* **27**, 241-251.
- Videla, H.A., Guiamet, P.S., Gómez de Saravia, S. (2000) *Int. Biodet. Biodeg.* **45**, 335-341.
- Walch, S.A., Ullman, W.J. (1993) *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**, 2725-2736.
- Walch, S.A., Vandevivere, P. (1995) *Geomicrobiol. J.* **12**, 227-238.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990) *Nature (London)* **345**, 63-65.
- Webley, D.M., Henderson, M.E.K., Taylor, I.F. (1963) *J. Soil Sci.* **14**, 102-112.
- Weed, S.B., Davey, C.B., Cook, M.G. (1969) *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **33**, 702-706.
- Williams, M.E., Rudolph, E.D. (1974) *Mycologia*. **6**, 648-680.
- Winkler, E.M. (1976) En: *The conservation of stone II*. Proc. 2nd Internat. Symp., R. Rossi-Manaresi (ed.), Centro per la Conservazione della Sculture all'Aperto, Bologna, Italy, 27-36.
- Wollenzien, U., de Hoog, G.S., Krumbein, W.E., Urzi, C. (1995) *Sci. Total Env.* **167**, 287-294.
- Young, P. (1996) *New Sci.* **152**, 36-38.
- Zanardini, E. et al. (2000) *Internat. Biodet. Biodeg.* **45**, 35-42.

# MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM BIOFILMES

Denise de Sousa Saad<sup>1</sup>, Christine Gaylarde<sup>2</sup>, Graham Kinsey<sup>3</sup>,  
Seungbum Kim<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Estruturas e Construção Civil, UFSM, Brasil*  
*e-mail: desaad@hotmail.com*

<sup>2</sup>*Departamento de Biofísica, UFRGS, Brasil - e-mail: cgaylarde@yahoo.com*

<sup>3</sup>*Cabi Bioscience, Reino Unido - e-mail: g.kinsey@cabi.org*

<sup>4</sup>*Cabi Bioscience Reino Unido - e-mail: s.kim@cabi.org*

## RESUMO

Neste trabalho relata-se o emprego de duas técnicas para detecção do crescimento fúngico em materiais de construção. Para avaliação da contaminação fúngica emprega-se avaliação de ergosterol, lipídeo da membrana celular fúngica. A determinação da biodiversidade emprega-se duas técnicas de biologia molecular a reação polimerase em cadeia (PCR) e gel em eletroforese com gradiente de desnaturante (DGGE).

As técnicas empregadas permitem a detecção de fungos em biofilmes contaminantes dos materiais de construção.

**Palavras chave:** Fungos, biofilmes, biologia molecular, materiais de construção

## INTRODUÇÃO

Sabe-se que microrganismos podem ser responsáveis pela destruição de prédios históricos. Bactérias alteram a superfície através da sua própria coloração e pelos metabólitos excretados (Rollecke *et al.*, 1998). Fungos, além dos problemas químicos, tais como redução e oxidação do substrato, podem levar a destruição mecânica através da penetração no substrato de suas estruturas filamentosas, as hifas. (Berner *et al.*, 1997).

Saraf *et al.* (1997) indicam que microrganismos provenientes de amostras ambientais poderão ser cultivados em meios para a sua identificação e quantificação, entretanto citam estudos que relatam que somente 0,1 a 10% do total dos microrganismos podem ser analisados através de técnicas convencionais empregadas. Os autores sugerem, portanto, métodos alternativos a serem empregados.

O emprego de técnicas moleculares pode auxiliar na compreensão da biodiversidade, sendo um método adicional para a detecção e identificação de microrganismos, os quais atuam no processo de deterioração do patrimônio cultural. Estas técnicas também poderão ser utilizadas na tomada de decisão do processo mais conveniente a ser empregado para a recuperação do bem, sem causar outros tipos de danos.

Além disso, biomarcadores embasados em moléculas específicas fúngicas estão sendo empregados para a análise do desempenho de processos que visam evitar ou retardar a deterioração. Dentre estes cita-se o emprego do ergosterol, lipídeo característico da membrana fúngica, que está sendo empregado como biomarcador.

Este trabalho tem por objetivo a utilização de técnicas moleculares para a detecção de fungos deteriorogênicos, incluindo o emprego de ergosterol como biomarcador para a verificação da deterioração fúngica.

## **MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM PRÉDIOS**

Os métodos tradicionais para isolamento de fungos empregam meios com nutrientes necessários para o desenvolvimento do micélio e esporulação dos fungos visando seu isolamento e identificação. Estes meios são seletivos, ou seja dependendo do meio utilizado o fungo poderá crescer ou não. Além disso, estes métodos convencionais requerem tempo para o crescimento e esporulação. Portanto o emprego de métodos mais rápidos e menos seletivos faz-se apropriado.

### **Métodos Moleculares para Extração de DNA**

A escolha de métodos moleculares para a detecção de fungos entre outros foi devido a vantagens que o mesmo apresenta sobre as técnicas convencionais. Além do já citado problema de cultivo dos microrganismos, através de técnicas convencionais, pode-se citar que são necessários somente pequenas quantidades de DNA (entre 0,1 a 10 ng), as quais serão amplificadas via PCR (Reação Polimerase em Cadeia). O emprego da dupla fita de DNA, em substituição a fita simples de RNA, diminui a possibilidade de erros durante o processo de amplificação. (White et al., 1990). Além disto, tem-se um menor tempo de preparo destas técnicas e os resultados são obtidos mais rapidamente, comparativamente as técnicas convencionais.

### ***Reação Polimerase em Cadeia***

Este processo, mais comumente chamado de PCR, foi



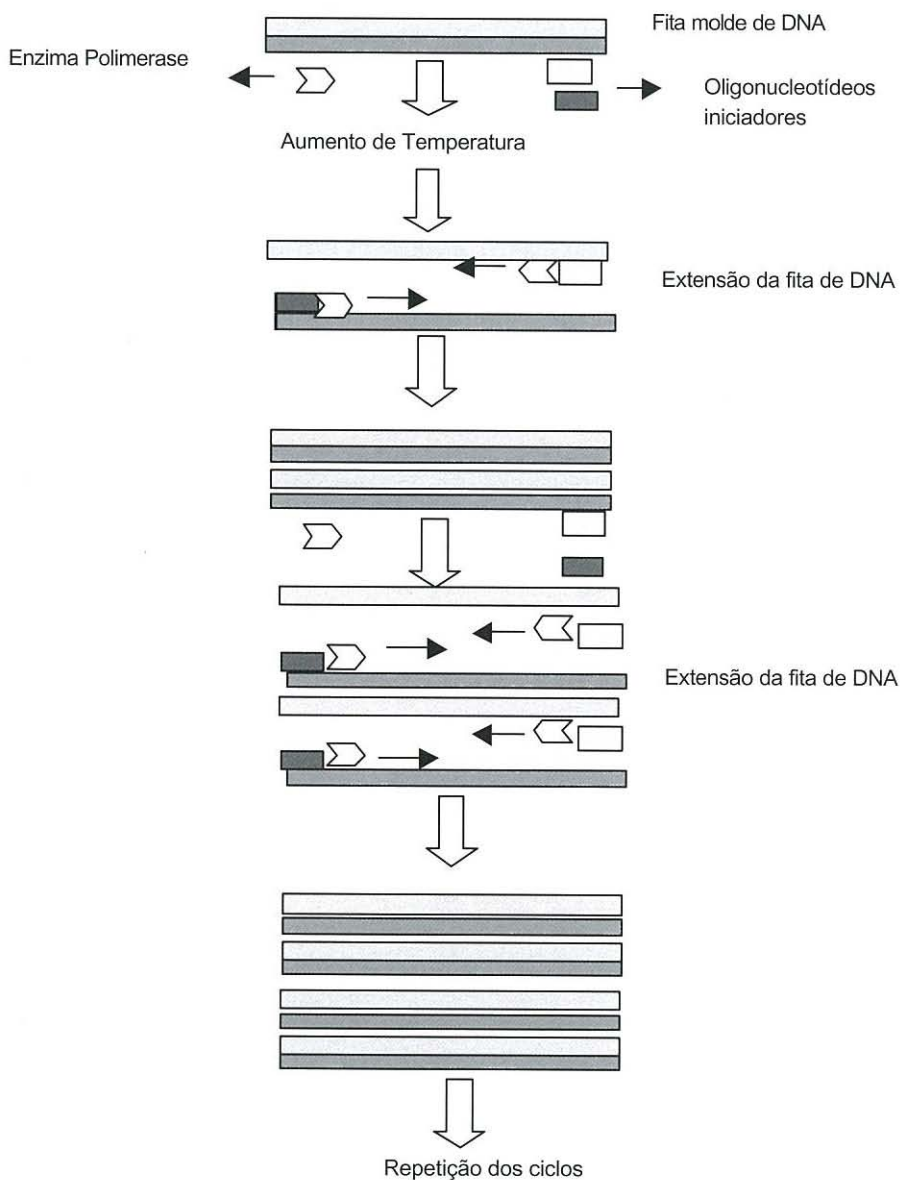
desenvolvido por Kary Mullis. Ele possibilita pequenas quantidades de DNA serem amplificadas *in vitro* para posterior análise. Para que a replicação ocorra é preciso a adição de um tampão, que fornece o pH próximo ao celular, nucleotídeos, que são as unidades formadoras do DNA, os primers, ou seja, fitas simples para iniciar a replicação, bem como a enzima polimerase que irá adicionar os nucleotídeos de acordo com a necessidade. A mistura é realizada e o exemplar de DNA, a ser amplificado, é adicionado.

O processo consiste basicamente nas seguintes etapas. Inicialmente, a molécula de DNA é aquecida em torno de 98°C para a sua desnaturação, ou seja, a fita dupla de DNA é separada tornando-se simples, pois o aumento de temperatura rompe as pontes de H existentes entre as bases nitrogenadas. Após, os primers, sequência de aproximadamente 30 ou 40 nucleotídeos, ligam-se a extremidade 3' da fita, para que o processo de replicação se inicie. A esta etapa denomina-se de anelamento dos primers. Na etapa seguinte, a enzima polimerase adiciona ao primer anelado, os nucleotídeos necessários de acordo com a fita molde, sendo esta etapa denominada de extensão. O processo é repetido inúmeras vezes, propiciando a replicação de pequenas quantidades de DNA a ser analisada posteriormente utilizando outras técnicas moleculares.

Após, os produtos de PCR são separados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

O genoma fúngico apresenta-se como um dos menores em eucariotos (Griffin, 1991), mas sendo maior que o genoma bacteriano. O uso de DNA ribossomal para identificação e taxonomia das bactérias já esta bem desenvolvido. A escolha do DNA ribossomal para amplificação via PCR, esta embasado no fato que este apresenta o mesmo perfil entre diferentes bactérias, situação que é igual entre os fungos. Nos fungos, os genes 17S, 5,8S e 25S estão sempre ligados formando uma única unidade transcricional, apresentando-se como uma unidade altamente conservada entre espécies. Estas regiões estão separados por espaçadores denominados de espaçadores internos transcritos (ITS - "internal transcribed spacers"), cuja região é altamente variável entre espécies, sendo portanto seu emprego adequado para a diferenciação a nível de espécie.

Após a amplificação do DNA das amostras ambientais, os mesmos podem ser separados via eletroforese, empregando métodos tais como DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação), o que permite a separação dos fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com diferentes sequências de pares de bases, permitindo a detecção dos diversos organismos envolvidos no processo de deterioração.



**Figura 1:** Esquema da Reação Polimerase em Cadeia (PCR)

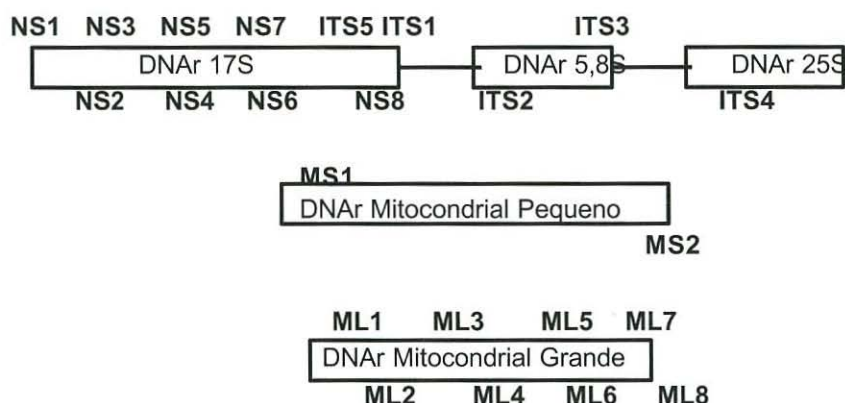
## **Primers que poderão ser Utilizados para amplificação via PCR**

Abaixo encontra-se listados e representados alguns primers possíveis de serem usados para amplificação dos genes de DNAr nuclear e mitocondrial de fungos via PCR.

**TABELA 1**  
Primers para a amplificação do DNAr (White *et al.*,1990)

DNAr	Primers	Tamanho do Produto (bp)
Nuclear, pequeno		
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	555
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	
Nuclear, ITS		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	290
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	330
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Mitocondrial, pequeno		
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC	
Mitocondrial, grande		
ML1	GTA C T T T T G C A T A A T G G G G T C A G C	253
ML2	T A T G T T T C G T A G A A A C C A C G	
ML3	G C T G G T T T T C T A C G A A C A T A T T T A A G	934
ML4	G A G G A T A A T T T G C C G A G T T C C	
ML5	C T C G G C A A A T T A T C C T C A T A A G	359
ML6	C A G T A G A A G C T G C A T A G G G T C	
ML7	G A C C C T A T G C A G C T T C T A C T G	735
ML8	T T A T C C C T A G C G T A A C T T T T A T C	





### ***Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE)***

Diversos autores tem discutido as limitações de utilizar-se métodos convencionais de identificação, tais como o cultivo em meio e a identificação com o emprego de microscopia, dos microrganismos encontrados em diferentes amostras ambientais. Tais métodos são impróprios pois não permitem definir a real diversidade dos microrganismos presentes no ambiente em estudo. Alguns estudos recentes, baseados em biologia molecular parecem adequar-se mais a este tipo de análise. Dentre as técnicas empregadas encontra-se o método denominado de Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE). Este método baseia-se na possibilidade de separação de fragmentos de ácidos dexossiribonuclêicos com diferentes seqüências em solução, o que permite a visualização imediata da diversidade microbiana do ambiente em estudo.

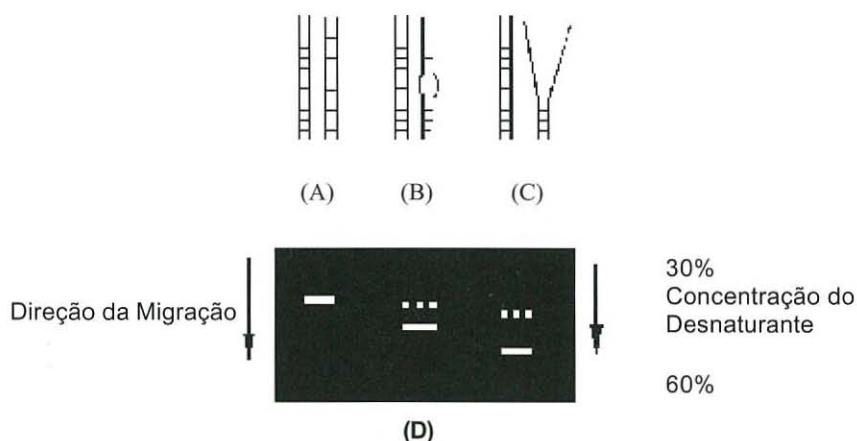
No método proposto, os fragmentos de ácidos nucleicos ficam submetidos a variação da concentração do desnaturante, linearmente equivalente a variação de temperatura. Esta variação leva a separação (melt) da dupla fita de DNA em segmentos discretos, denominados de Domínios de Separação (Melting Domains), o que acarreta, portanto, na redução da mobilidade da molécula de DNA na matriz do gel. Como os produtos de amplificação dos microrganismos devem apresentar diversos domínios de separação isto permite a geração de bandas, sendo com isso possível uma análise semi-qualitativa da diversidade microbiana da amostra em estudo (Myers *et al.*, 1990).

Este método permite a detecção de diferenças mínimas ao longo das seqüências do DNA dos microrganismos, tais como a substituição, deleção ou inserção de uma simples base (Myers *et al.*, 1987).

A combinação do método de amplificação do DNA através da reação polimerase em cadeia com o método proposto permite o estudo da diversidade, composição e dinâmica da comunidade microbiana, o que acarreta no incremento do conhecimento da ecologia e permite a detecção de microrganismos desconhecidos no ambiente em estudo.

Muyzer *et al.* (1995) também enfatiza as dificuldades da metodologia convencional de cultivo em meio e identificação e justifica a aplicação do método para estudos de comunidades microbianas, tais como biofilmes, sugerindo que o mesmo pode ser utilizado para responder questões sobre a composição da comunidade, sua estrutura e estabilidade.

Smit *et al.* (1998), estudando a biodiversidade da rizosfera, confirma que a combinação destes dois métodos anteriormente citados, PCR e DGGE, tem-se mostrado como uma técnica válida para elucidar as diferenças e variações na comunidade existente.



**Figura 3:** Domínios de desnaturação de um fragmento de DNA  
(A) Dupla fita de DNA; (B) Domínio I, desnaturação interna, (C) Domínio II, desnaturação parcial da fita de DNA, (D) posição das fitas no gel de DGGE  
(adaptado de Abrams e Stanton, 1992).

## Ergosterol

O ergosterol é um componente da membrana celular dos fungos, que pode ser utilizado como marcador da presença e quantidade destes microrganismos. O princípio da avaliação empregando o ergosterol consiste em quantificar o ergosterol presente em um substrato sólido contaminado por fungos e procurar relacioná-lo com a quantidade de

massa fúngica presente. (Gessner e Newell, 1997). Esta técnica tem sido empregada em diferentes sistemas, tais como, micorrizas, solos e sedimentos marinhos.(Suberkropp *et al.*, 1993), mas nunca foi utilizada em superfícies rochosas ou pintadas.

A detecção do ergosterol através da HPLC poderia ser realizada em poucas horas, sendo portanto, um método rápido e sensível, comparado a outras técnicas rápidas tais como a avaliação da quitina (Martin *et al.*, 1990, Schnurer, 1993).

Pasanen *et al.* (1999) sugerem que técnicas para determinação da concentração de ergosterol poderia ser utilizada adequadamente para estimar a contaminação fúngica de materiais de construção, tais como ocorre com a análise de solos, sistemas aquáticos e produtos agrícolas. Os autores concluem que a introdução de um método rápido, barato, automatizado e preciso seria indicado para avaliar a contaminação de ambientes internos, apesar da necessidade de uma avaliação crítica do mesmo.

Diversos trabalhos procuram determinar a concentração de ergosterol por esporo ou pelo peso do micélio seco, para diferentes fungos. Alguns valores são indicados na tabela seguinte

**TABELA 2**  
Concentração do ergosterol por esporo

<b>Autores</b>	<b>Tipo de fungo</b>	<b>Teor de Ergosterol</b>
Pasanen et al. (1999)	<i>A. versicolor</i>	2,5 pg/esporo
	<i>P. brevicompactum</i>	2,6 pg/esporo
	<i>C. cladosporioides</i>	3,1 pg/esporo
	Hifomicetos e Ascomicetos	Faixa de variação entre 2,3 a 11,9 mg/mg de micélio seco.
Suberkropp et al. (1993)	Hifomicetos aquáticos	Faixa de variação entre 2,3 a 11,5 mg/g de massa seca.
Saraf. et. at. (1997)	Fungos contido em poeira doméstica	Faixa de variação entre 2,3 a 11,5 mg/g de massa seca.
Antibus e Sinsabaugh (1993)	Fungos de ectomicorriza	Faixa de variação entre 3,0 a 11,0 mg/g de massa seca.
Newell et al. (1988)	<i>Gibberella fukifuroi</i>	0,5 a 1,0 mg/g de massa seca.
	<i>Alternaria</i> e <i>Aspergillus</i>	2,3 a 5,9 mg/g de massa seca.
	<i>Mucor</i> sp.	1,4 a 7,2 mg/g de massa seca.
	<i>Acremonium coenophialum</i>	10 mg/g de massa seca.

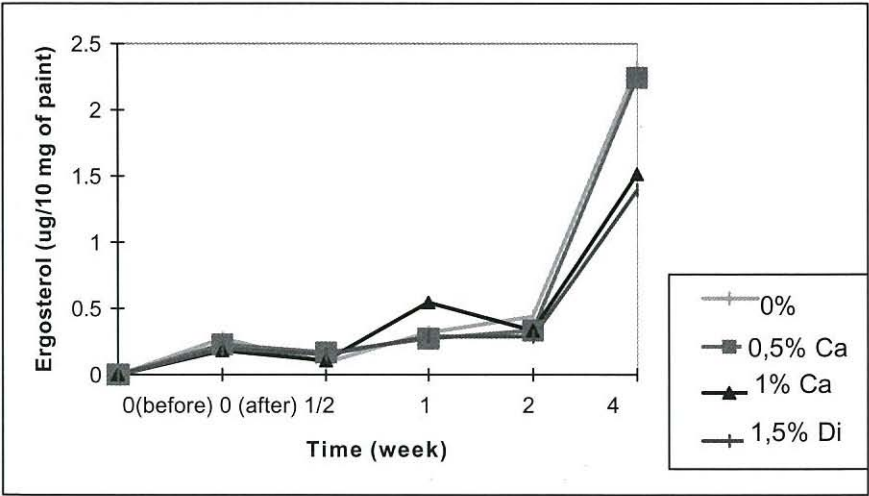


# Emprego das Técnicas Moleculares em Superfícies Contaminadas

A análise das superfícies contaminadas é realizada fazendo-se a raspagem da área onde o biofilme encontra-se presente. A partir do material obtido realiza-se a extração do DNA empregando-se para tanto o kit de extração Qiagen. Após a extração o DNA é amplificado via PCR utilizando-se o par de primers ITS1 e ITS2-GC. Este segundo primer contém uma sequência de bases GC que permitirá a separação das fitas de DNA amplificadas no gradiente de desnaturante, o que possibilita a visualização de bandas indicando os microrganismos presentes na figura abaixo. A técnica foi empregada em fungos isolados de paredes contaminadas para verificar o seu desempenho.

Adicionalmente a este processo, tem-se empregado a técnica de extração de ergosterol utilizando forno convencional de microondas (Young, 1995) para extrair a molécula do biofilme raspado.

O Gráfico abaixo indica o desempenho de uma tinta residencial acrílica com e sem a aplicação de biocida.



## CONCLUSÃO

O emprego destas técnicas em Materiais de Construção tem-se mostrado adequado, sendo os resultados promissores e demonstrando a possibilidade das mesmas serem empregadas na conservação de monumentos históricos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abrams, E.S., Stanton Jr., V.P. (1992) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods in Enzymology*, **212**, Academic Press, 71-104.
- Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L. (1993) The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. *Mycorrhiza* **3**, 137-144.
- Berner, M., Wanner, G., Lubitz, W. (1997) A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the Castle Herberstein and in the Parish church of St. Georgen in Styria, Austria. *International Biodegradation and Biodeterioration* **40(1)**, 153-61.
- Gessner, M.O., Chauvet, E. (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **59(2)**, 502-507.
- Gessner, M.O., Newell, S.Y. (1997) Bulk quantitative methods for the examination of eukariotic organoosmotrophs in plant litter. Em: Hurst, C.J. Knudsen, G.R. McInerney, M.J. Stezezbach, L.D. Walter, M.V. (eds.) *Manual of Environmental Microbiology*, Washington: ASM Press, 295-308.
- Griffin, D.H. (1994) *Fungal Physiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. Publication, 458 p.
- Martin, F., Delaruelle, C., Hilbert, J.L. (1990) An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research* **94(8)**, 1059-1064.
- Muyzer, G., Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59(3)**, 695-700.
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S. (1987) Detection and Localization of single base changes by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. *Methods in Enzymology* **155**, 501-527.
- Myers, R.M., Sheffield, V.C., Cox, D.R. (1990) Mutation Detection by PCR, GC-clamp, and Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. Em: Erlich, H.A. (ed.) *PCR Technology: Principles and Aplications for DNA Amplification*. New York, Stockton Press, 71-88.
- Pasanen, A.L., Pietila, K.Y., Pasanen, P., Kaliokoski, P., Tarhanen, J. (1999) Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology* **65(1)**, 138-142.
- Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W. (1998) Medieval wall paintings-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**, 85-92.

- Saraf, A., Larsson, L., Burge, H., Milton, D. (1997) Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7), 2554-2559.
- Schnürer, J. (1993) Comparison of methods for estimation the biomass of three food-borne fungi with different patterns. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(2), 502-507.
- Suberkropp, K., Gessner, M.O., Chaveut, E. (1993) Comparison of ATP and Ergosterol as indicators of fungal biomass with decomposing leaves in streams. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(10), 3367-3372.
- Young, J.C. (1995) Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol total fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* **43**(11), 2904-2910.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. White, T.J. (eds.) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. São Diego: Academic Press, 315-322.



# ESTUDIO COMPARATIVO DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN MONUMENTOS MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES Y MICROBIOLOGICAS

G. Piñar<sup>1</sup>, L. Laiz<sup>2</sup>, W. Lubitz<sup>1</sup> y C. Saiz-Jiménez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Viena, A-1030 Viena, Austria. <sup>2</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Apartado 1052, 41080, Sevilla, España.  
e-mail: saiz@irnase.csic.es

## RESUMEN

La aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S, permite el estudio de las comunidades bacterianas no cultivables de los monumentos y su comparación con las cultivables.

**Palabras clave:** biodeterioro, comunidades microbianas, bacterias halófilas, *Archaea*, PCR, DGGE, librerías clónicas.

**Abreviaturas:** PCR, reacción en cadena de la polimerasa; DGGE, electroforesis en gel de gradiente de desnaturalizantes.

## INTRODUCCION

Los microorganismos son uno de los principales causantes del deterioro de materiales (Bock y Sand, 1993; Saiz-Jiménez, 1994). Las comunidades microbianas asociadas a tales materiales son en parte responsables del deterioro químico y físico sufrido por los mismos, alterando a través de distintos mecanismos su apariencia estética y su integridad física. La excreción de enzimas y la producción de ácidos orgánicos disuelve los componentes estructurales de los distintos sustratos, contribuyendo así al proceso de deterioro (Krumbein, 1988).

Los esfuerzos realizados para eliminar los microorganismos que contribuyen al deterioro de monumentos han sido en general inefectivos, debido al desconocimiento de la diversidad microbiana existente en dichos objetos. En este contexto, sería conveniente realizar proyectos interdisciplinares de restauración, con la colaboración de restauradores y microbiólogos, para un buen asesoramiento del modo y la extensión en la aplicación de un determinado proceso de limpieza y restauración. Asimismo, sería razonable controlar los cambios sufridos por las comunidades microbianas después de la aplicación de un

tratamiento de restauración, para poder realizar una evaluación del impacto causado por el mismo.

Tradicionalmente, la estrategia a seguir cuando se ha abordado el estudio de comunidades microbianas responsables del deterioro sufrido por monumentos ha sido el uso de técnicas microbiológicas. Estas técnicas conllevan una serie de ventajas, tales como obtener cultivos puros de los microorganismos presentes en monumentos, con la consiguiente posibilidad de estudiar las actividades metabólicas de los mismos, y su posible relación en cuanto al deterioro sufrido por el objeto. No obstante, estas técnicas llevan asociadas una serie de desventajas. La cantidad de muestra necesaria para diseñar una buena estrategia de cultivo (con distintos medios de cultivo, T<sup>a</sup>, humedad, pH, etc) normalmente excede a la cantidad de muestra que es posible obtener de dichos objetos. Con los métodos microbiológicos convencionales, solo una pequeña proporción de los microorganismos presentes en una comunidad microbiana pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990). Microorganismos de crecimiento lento, pero potencialmente involucrados en el deterioro de monumentos, pueden ser no detectados mediante técnicas microbiológicas en presencia de otros, de crecimiento rápido, que no estén directamente implicados en el proceso de biodeterioro (Bianchi et al. 1980). En las últimas décadas la aplicación de técnicas microbiológicas convencionales ha proporcionado una aceptable idea del tipo de microorganismos presentes en las superficies de monumentos deteriorados (Saiz-Jiménez, 1995, 1997; Ariño et al. 1997; Groth et al. 1999), aunque como puso de manifiesto Saiz-Jiménez (1994), la presencia de un microorganismo sobre un material deteriorado no implica necesariamente que éste haya causado el daño observado. De la Torre et al. (1991) observaron que los hongos aislados de la piedra de la catedral de Salamanca se correspondían con los habitualmente presentes en el aire. Saiz-Jiménez (1993) consideró que, además de los microorganismos saprofíticos que aparecían en los medios de cultivo ricos en fuentes de carbono (procedentes de esporas que germinaban rápidamente en esas condiciones favorables), existía otro tipo de microflora autóctona, que no crecía en los medios de cultivo y que era realmente la que funcionaba en el ecosistema. Estos microorganismos eran difíciles de aislar y si ello se conseguía, en su mayor parte, no podían ser identificados.

Una segunda estrategia a seguir en el estudio de comunidades microbianas, es el uso de técnicas moleculares. La biología molecular se introdujo a principios de los años 1990 para estudiar la diversidad microbiana en diferentes hábitats (Ward et al. 1990; Amman, 1995). Mediante la nueva tecnología del ADN y ARN es posible identificar especies microbianas existentes en distintas muestras ambientales sin



necesidad de realizar cultivos previos. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, es posible dar adecuada respuesta a muchos de los interrogantes que sobre ecología microbiana de monumentos se planteaban en el pasado. Estas técnicas, aplicadas al estudio de las comunidades bacterianas de monumentos, han ampliado el número de géneros bacterianos identificados y catalogados como capaces de crecer sobre superficies pétreas, pinturas murales, cuevas, etc.

En un hábitat tan específico como el de los monumentos en distintas fases de deterioro, las técnicas microbiológicas tradicionales han proporcionado el aislamiento de un gran número de bacterias heterotróficas y han establecido la abundancia de especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptomyces* (Tiano, 1993; Saiz-Jiménez, 1994, 1995; González et al. 1999; Groth et al. 1999; Laiz et al. 2000). Sin embargo, determinados grupos bacterianos, como los del dominio *Archaea*, u otras bacterias halófilas, no han sido aun aislados utilizando medios de cultivo en el laboratorio. Esto no refleja la realidad de los monumentos, donde en su mayoría existe una elevada concentración de sales debido a la formación de eflorescencias y, consiguientemente, pueden representar hábitats extremos que estarían ocupados por organismos extremófilos. Ya en 1935, Hof comentó que una mayoría de bacterias eran capaces de crecer en concentraciones superiores al 15% de sales y que muchos microorganismos eran fisiológicamente activos incluso a concentraciones salinas más altas. Es posible que uno de los factores que contribuyen a la falta de información respecto a determinadas comunidades microbianas que albergan los monumentos haya sido el uso de medios de cultivo empleados habitualmente en el laboratorio, y que llevan poca concentración o ninguna de sales, lo que impide el crecimiento de bacterias halófilas.

Recientemente, los estudios se han enfocado hacia la búsqueda de comunidades halófilas y *Archaea* en monumentos deteriorados (Röllerke et al. 1998; Piñar et al. 2001). Saiz-Jiménez y Laiz (2000) estudiaron la composición bacteriana de eflorescencias de monumentos empleando técnicas microbiológicas convencionales. En estos casos no pudieron aislarse bacterias capaces de crecer a concentraciones superiores al 20 % de sales, pero se demostró la abundancia de especies halotolerantes del género *Bacillus*. Röllerke et al. (1996) investigó las comunidades microbianas de pinturas murales deterioradas mediante técnicas moleculares, no encontrando especies de *Bacillus*. La abundancia de colonias de *Bacillus* cuando se usan técnicas de aislamiento y la no detección de las bandas correspondientes en el patrón de DGGE de los productos de PCR que



se obtienen de muestras de monumentos necesita una explicación y, al mismo tiempo, indicaría las limitaciones de ambos métodos.

## **CASOS ESTUDIADOS**

### **Capilla del Castillo de Herberstein, Styria, Austria**

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la flora presente en las pinturas murales del siglo XIV de la capilla del Castillo de Herberstein. Los frescos fueron restaurados en 1950, pero actualmente se encuentran muy deteriorados debido al crecimiento de hongos (Berner et al. 1997) y otros microorganismos (Rölleke et al. 1996, 1998; Gurtner et al. 2000). Se muestreó un área que presentaba color rosa y se llevaron a cabo estudios microbiológicos y moleculares.

### **Iglesia de San Martin, Greene, Niedersachsen, Alemania**

La Iglesia de San Martin en Greene fue construida en 1493 sobre los cimientos de una antigua basílica. En los últimos años se han llevado a cabo estudios sobre la flora presente en las pinturas murales que datan del siglo XVI. Los frescos fueron restaurados entre los años 1978 y 1980. Actualmente se encuentran muy deteriorados mostrando un marcado crecimiento de hongos sobre su superficie.

### **Tumba de Servilia, Necrópolis de Carmona, Sevilla, España**

Esta tumba es la mayor de las que contiene la Necrópolis romana de Carmona. La cámara funeraria está decorada con pinturas murales y, además de dos puertas de acceso, presentaba una abertura en la cúpula. Ésta se cerró hace algunas décadas, produciéndose la proliferación de organismos fototróficos, puesto que la humedad relativa es bastante alta y la temperatura se mantiene constante. En la actualidad la cúpula está de nuevo abierta. Se tomaron muestras en diferentes zonas, con objeto de cubrir el amplio rango de situaciones ecológicas localizadas.

### **Sistema experimental para el estudio de monumentos**

Intentando avanzar en el conocimiento de la diversidad microbiana existente en monumentos y de los factores que controlan la abundancia y distribución de las poblaciones microbianas, se planteó la creación de un modelo experimental estandarizado utilizando distintos tipos de materiales comunes en monumentos. Estos materiales fueron

impregnados con medios de cultivo utilizados rutinariamente en el laboratorio para el aislamiento de microorganismos presentes en monumentos.

Se seleccionaron tres tipos de materiales: arenisca de Villamayor, caliza de Hontoria y mortero. Estos materiales se embebieron en medios de cultivo ricos, con y sin suplemento salino: Medio "Trypticase Soy Broth" (TSB) y medio TSB + 20% Na Cl + 2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (TSBS). A continuación los materiales fueron inoculados con una población microbiana artificialmente creada en el laboratorio y se incubaron a 28°C.

La población microbiana fue seleccionada en base a los datos existentes de bacterias aisladas con mayor frecuencia en frescos, pinturas murales y cuevas. Hay que tener en cuenta que la flora microbiana de un determinado nicho es el resultado de la colonización sucesiva y el establecimiento de complejas relaciones entre sus componentes, a lo largo de los años. La población artificial se creó a partir de 14 especies tipo pertenecientes a las colecciones de cultivo española, alemana y belga que aparecen en la Tabla 1.

**TABLA 1**  
Población bacteriana del sistema experimental

<b>Bacterias</b>
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> LMG 3822
<i>Arthrobacter oxydans</i> LMG 3816
<i>Bacillus megaterium</i> CECT 4313
<i>Bacillus pumilus</i> CECT 29
<i>Brevibacillus laterosporus</i> CECT 15
<i>Chromobacterium violaceum</i> CECT 494
<i>Halomonas halophila</i> LMG 6456
<i>Halococcus morrhuae</i> DSM 1307
<i>Kocuria rosea</i> CECT 52
<i>Methylobacterium extorquens</i> LMG 4250
<i>Micrococcus luteus</i> CECT 51
<i>Paenibacillus polymyxa</i> CECT 155
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CECT 930

\*CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia, España.

\*DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen GmbH, Braunschweig, Alemania.

\* LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Faculteit der Wetenschappen, Gent, Bélgica.

Un 57% de las bacterias fueron Gram-positivas aisladas con elevada frecuencia en pinturas murales y un 36% Gram-negativas aisladas con cierta frecuencia en cuevas. Además, se añadió *Halococcus morrhuae* (Gram-variable), perteneciente al grupo halófilo del dominio *Archaea*, cuya presencia ha sido demostrada en pinturas murales mediante técnicas moleculares (Piñar et al. 2001).

Este modelo permite establecer, bajo condiciones controladas y a corto plazo, qué especies colonizan mejor un sustrato dado y cómo evoluciona la flora microbiana capaz de crecer en función del tipo de sustrato. Por otra parte, a largo plazo, también permitirá estudiar cómo se modifica la composición química del sustrato por la colonización microbiana y cómo estas modificaciones conducen al establecimiento de sucesivas comunidades microbianas.

## **TÉCNICAS UTILIZADAS**

### **Técnicas microbiológicas**

#### ***Cultivo de los microorganismos***

Para el aislamiento de los microorganismos presentes en los monumentos citados en el apartado 2, se han utilizado medios de cultivo que cubren los requerimientos nutricionales de la mayor parte de estos microorganismos, particularmente los medios descritos por Laiz et al. (1999) y por Incerti et al. (1997). Esto implica la inoculación en medios de cultivo con concentraciones crecientes de sal, principalmente cloruro sódico y sulfato de magnesio; pero también con otros tipos de sales (DasSarma et al. 1995). Las placas de petri se incubaron a 28°C y a 37°C durante 4 semanas.

#### ***Identificación de los microorganismos: MIDI.***

Tradicionalmente, la identificación de los microorganismos no ha sido tarea fácil. Las diferentes técnicas empleadas estaban basadas en complejas reacciones bioquímicas, difíciles de reproducir y cuya interpretación se fundamentaba en conocimientos de lenta evolución.

En los últimos años se han desarrollado los sistemas de identificación automática de microorganismos que facilitan enormemente la reproducibilidad de resultados entre los laboratorios microbiológicos de todo el mundo. Entre los sistemas de identificación más utilizados están los que asocian una galería bioquímica miniaturizada con una base de datos y los que comparan los



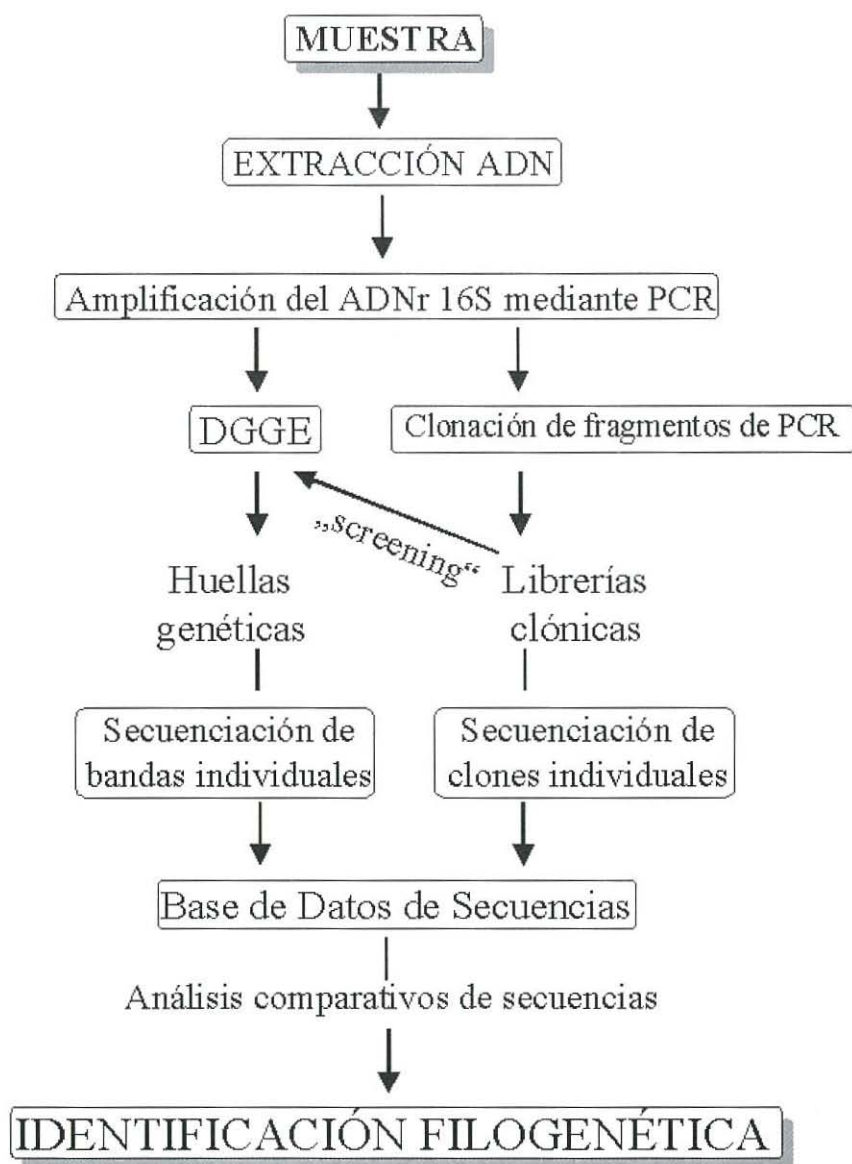
cromatogramas de una serie de compuestos celulares con estructura de ácido graso o similar, también con una base de datos.

Entre estos últimos, el más utilizado es el sistema de identificación automática MIDI. El sistema MIDI se basa en la cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares (FAME) de cadena corta, concretamente de 9 a 20 átomos de carbono. El sistema MIDI utiliza, además de los ésteres metílicos de los ácidos grasos lineales o ramificados, los de compuestos relacionados, como aldehídos y dimetilacetales. Esto le confiere un gran poder de resolución, pues se han encontrado más de 300 compuestos de este tipo y la información que proporcionan los correspondientes picos cromatográficos es utilizada cuantitativa y cualitativamente por el sistema. MIDI ha desarrollado las bases de datos de los perfiles FAME de numerosas cepas de levaduras y bacterias anaerobias y aerobias, incluyendo micobacterias. Con estas bases de datos se han construido un total de 8 librerías. Para la caracterización de las poblaciones bacterianas de monumentos se ha utilizado la librería TSBA 4.0.

## **Técnicas moleculares**

La estrategia utilizada para la identificación de microorganismos en monumentos sin un cultivo previo de los mismos comprende los siguientes pasos: i) extracción del material genético (ADN o ARN); ii) la amplificación de determinadas secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); iii) la separación de fragmentos de ADN dependiendo de su secuencia, con la consiguiente producción de patrones de bandas genéticos; iv) la secuenciación de los fragmentos de ADN previamente separados, de forma directa o bien a través de la creación de librerías clónicas; v) la identificación de microorganismos mediante análisis comparativos de secuencias.

La Figura 1 esquematiza los pasos anteriormente descritos para identificar microorganismos presentes en monumentos sin necesidad de ser cultivados.



**Figura 1:** Diagrama de la estrategia a seguir en el estudio de comunidades microbianas de monumentos mediante técnicas moleculares.

### ***Extracción de ADN de muestras de monumentos***

La extracción de ADN es extremadamente importante, ya que va a determinar la calidad de los análisis posteriores. El método a utilizar tiene que ser efectivo para cualquier tipo de microorganismos. Aquellas

células que no puedan ser lisadas de forma eficiente, no serán detectadas mediante análisis moleculares. El método utilizado para la extracción de ADN de muestras de monumentos ha sido el descrito por Schabereiter-Gurtner et al. (2001), que consiste básicamente en una ruptura enzimática de las células en combinación con un tratamiento químico-físico.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la calidad del ADN extraído. Normalmente las muestras obtenidas de monumentos contienen sustancias inhibitoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para evitar falsos resultados negativos causados por las sustancias inhibitoras, el ADN extraído de monumentos es purificado antes de ser utilizado como ADN molde para su amplificación.

### ***Amplificación del ADN que codifica para el ARN 16S***

El ADN es amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica ofrece la ventaja de suministrar suficiente material genético para la realización de los análisis posteriores a partir de una mínima cantidad de ADN molde y en un tiempo relativamente corto.

La elección de la secuencia que se desea amplificar, y por tanto de los "primers" a utilizar, es de gran importancia. Normalmente, para la identificación de microorganismos se amplifican secuencias del ADN que codifica para el ARNr 16S debido a que están presentes en todos los organismos y contienen regiones variables y regiones altamente conservadas, permitiendo así distinguir los organismos a cualquier nivel filogenético. Además, el crecimiento día a día de las bases de datos de secuencias de ARNr, permite comparar las secuencias de organismos conocidos con las secuencias obtenidas directamente de análisis moleculares, consiguiéndose así una identificación filogenética (Maidak et al., 1999).

En este estudio, se amplificaron 200 pares de bases del ADNr 16S, correspondientes a las posiciones 341-534 en la secuencia de *E. coli*. Para ello, se utilizó un "primer" específico para eubacterias, la secuencia 341fGC, que lleva unida a su extremo 5' una cola de 40 bases de GC para estabilizar la desnaturalización de los fragmentos de ADN en los análisis de DGGE (Muyzer et al. 1993). Como "primer" reverso se utilizó la secuencia universal 518r (Neefs et al. 1990). Las condiciones de la PCR fueron las descritas por Schabereiter-Gurtner et al. (2001).

Para la amplificación de ADN de *Archaea*, se utilizó un "primer" específico para el dominio *Archaea*, la secuencia ARC344 (Raskin et al. 1994). Como "primer" reverso se utilizó la secuencia universal 518rGC



(Neefs et al. 1990). Las condiciones de la PCR fueron las descritas por Piñar et al. (2001).

### **Análisis mediante Electroforesis en Gel de Gradiente de Desnaturalizantes (DGGE) de los productos de PCR derivados de muestras de monumentos**

Como resultado de la amplificación mediante PCR, se obtiene una mezcla de secuencias de ADNr de los distintos microorganismos presentes en la muestra analizada. Antes de proceder a la identificación de los microorganismos, las secuencias obtenidas deben ser separadas. Esta separación es posible mediante la utilización de electroforesis en gel de gradiente de desnaturalizantes (DGGE) o de gradiente de temperatura (TGGE) (Muyzer et al. 1993). Este método permite la separación de fragmentos de ADN de idéntica longitud (en pares de bases) pero distinta secuencia, debido a su distinto punto de desnaturalización en un sistema de electroforesis conteniendo un gradiente de desnaturalizantes (químico o temperatura). Como resultado de dicha electroforesis, se obtiene un patrón de bandas, en el cual cada banda representa un taxón microbiano en la muestra original. Posteriormente, las bandas individuales pueden ser cortadas del gel y secuenciadas. Esta técnica permite visualizar la complejidad de la comunidad microbiana presente en la muestra analizada, además de permitir la identificación de los miembros de dicha comunidad mediante la secuenciación de las bandas correspondientes. Finalmente, varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente en un mismo gel, permitiendo así la comparación de las comunidades microbianas de varias muestras a la vez.

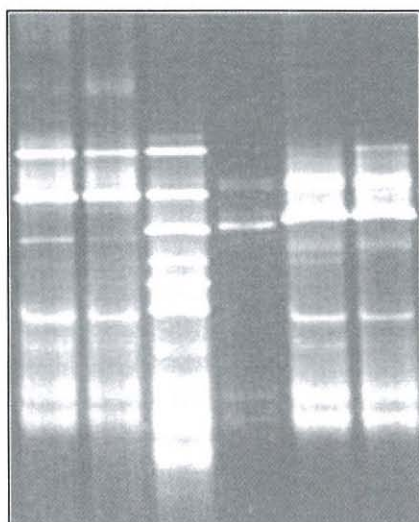
En este estudio, los análisis de DGGE se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Muyzer et al. (1993). El gradiente de desnaturalizantes utilizado en cada caso se describe en el apartado 4.

### **Preparación de un marcador de referencia para análisis de DGGE**

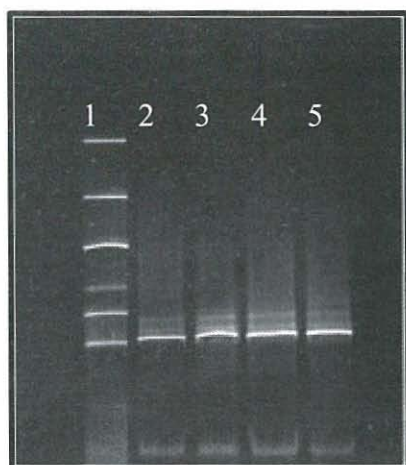
Para permitir la evaluación comparativa de los análisis de DGGE realizados en distintos geles, se preparó un marcador conteniendo productos de PCR amplificados a partir del ADNr 16S de 6 bacterias seleccionadas. Para ello se utilizaron los "primers" 341fGC y 518r. A tal fin, 100 µl de los productos de PCR, obtenidos a partir de cada una de las bacterias por separado, se combinaron y precipitaron con 96% de EtOH. Posteriormente se resuspendieron en agua bidestilada y se emplearon 10 µl como marcador para los análisis de DGGE. Los ADNs de las bacterias que se muestran en el marcador corresponden, de arriba hacia abajo, a *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus megaterium*,

*Micrococcus luteus*, *Arthrobacter histidinolovorans*, *Kocuria rosea* y *Halococcus morrhuae* (Figuras 2 y 3).

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6



**Figura 2:** DGGE teñido con bromuro de etidio mostrando los patrones de bandas de fragmentos de ADN que codifican para el ARNr 16S amplificados a partir de las poblaciones bacterianas del sistema experimental a los 6 meses de incubación. Los ADNs fueron amplificados utilizando primers específicos de eubacterias. El carril 1 corresponde a la población existente en sustrato de arenisca sin suplemento salino; el carril 2 corresponde a la población existente en sustrato de mortero sin suplemento salino; el carril 3 corresponde al marcador; el carril 4 corresponde al ADN de *Halomonas halophila*; el carril 5 corresponde a la población existente en sustrato de caliza con suplemento salino; el carril 6 corresponde a la población existente en sustrato de arenisca con suplemento salino.



**Figura 3:** DGGE teñido con bromuro de etidio mostrando los patrones de bandas de fragmentos de ADN que codifican para el ARNr 16S amplificados a partir de las poblaciones bacterianas del sistema experimental a los 6 meses de incubación. Los ADNs fueron amplificados utilizando primers específicos de *Archaea*. El carril 1 corresponde al marcador; el carril 2 corresponde a la población inicial sobre sustrato de caliza en el momento de la inoculación; el carril 3 corresponde a la población crecida en sustrato de caliza con suplemento salino; el carril 4 corresponde a la población crecida en sustrato de arenisca con suplemento salino; el carril 5 corresponde al ADN de *H. morrhuae*.

### **Clonación de los productos de PCR y “screening” de librerías clónicas**

Una vez separadas las distintas bandas de ADN<sub>r</sub> mediante DGGE, es necesaria su secuenciación para obtener la identificación filogenética de las mismas. A pesar de las muchas ventajas que el DGGE ofrece, este método también conlleva una serie de problemas técnicos cuando se trata de secuenciar bandas que han sido directamente cortadas y eluidas del gel. En patrones de bandas complejos es prácticamente imposible separar todos los fragmentos de ADN. Como consecuencia, los fragmentos no están lo suficientemente definidos como para ser cortados manualmente del gel.

Otro problema es la existencia de bandas solapadas. Secuencias distintas, pero con la misma proporción GC, pueden tener el mismo



comportamiento de desnaturalización, y por lo tanto la misma posición en DGGE. La inadecuada separación de bandas de DGGE y el fenómeno de bandas solapadas producen secuencias mixtas imposibles de ser secuenciadas directamente.

Un problema adicional es el causado por la propia longitud de los fragmentos de ADNr analizados en DGGE. El DGGE permite la separación de fragmentos de ADN de 200-500 pb con una buena resolución. Esto supone una limitación si se desea secuenciar fragmentos de mayor longitud.

Para solucionar todas estas limitaciones, paralelamente al análisis de fragmentos de 200 pb en DGGE, es posible construir librerías clónicas. La técnica consiste en introducir o clonar fragmentos de ADNr 16S de mayor longitud (600-1500 pb), amplificados directamente de la muestras obtenidas de monumentos, en un vector de clonación. Para ello, los productos de PCR amplificados a partir de la muestra original son clonados en un sistema de clonación en T (pGem-T Vector System, Promega), y transformados en *E.coli* XLI-Blue, lo cual permite seleccionar colonias blancas y azules (Sambrook et al. 1989).

Para seleccionar la presencia de insertos, las colonias blancas son picadas y lisadas mediante tres ciclos de congelación y descongelación. El sobrenadante es posteriormente utilizado como molde para una PCR utilizando los primers SP6 y T7 que se encuentran flanqueando la zona de clonación, según el protocolo descrito por Gurtner et al. (2001).

Para el "screening" de los distintos clones, se realiza una segunda reacción de PCR en la cual se amplifica un fragmento de 200 pares de bases que es posteriormente analizado en DGGE. La movilidad electroforética de los distintos clones es comparada entre sí. Los clones conteniendo distintas secuencias tendrán distinta movilidad. La posición de estos clones es comparada asimismo con la posición de las bandas del patrón de la muestra original. Los clones cuya posición en el gel coincide con las bandas del patrón de la muestra original son seleccionados para su posterior secuenciación.

### ***Secuenciación de los fragmentos de ADN ribosómico que codifica para el ARN 16S y análisis comparativo de las secuencias***

Los clones finalmente seleccionados son amplificados utilizando los primers SP6 y T7. Estos fragmentos son purificados y secuenciados con un secuenciador "LICOR DNA sequencer Long Read 4200" (Middendorf et al. 1992). Las secuencias obtenidas son comparadas con secuencias conocidas mediante la utilización de la base de datos de nucleótidos del EMBL. El programa de búsqueda del EMBL llamado FASTA se utiliza para obtener la afiliación filogenética.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Géneros identificados en monumentos mediante técnicas microbiológicas y moleculares

Los resultados obtenidos de los estudios realizados en los tres monumentos estudiados, Carmona, Herberstein y Greene, fueron en cierta medida discordantes, ya que se identificaron poblaciones microbianas diferentes a partir de la misma muestra, dependiendo de que ésta hubiera sido tratada mediante métodos moleculares o convencionales. Los géneros identificados aparecen en la Tabla 2.

Cuando se emplearon técnicas microbiológicas, la mayoría de las especies identificadas pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Kocuria*. Destacaron por su abundancia las especies *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. halodenitrificans*, *Paenibacillus polymyxa* y *P. pabuli*.

Cuando se emplearon técnicas moleculares se identificó una diversidad de especies mucho mayor. Sólo hubo coincidencia en el caso de algunas especies de los géneros *Arthrobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas*, que se identificaron con ambos métodos.

Esta discordancia también ha sido descrita en otros trabajos. En cultivos de enriquecimiento para bacterias quimiorganotrofas aisladas de aguas termales, sólo hubo coincidencia en el caso de dos especies del género *Thermus*: *T. aquaticus* y *T. ruber* (Santegoeds et al. 1996). En otro trabajo, las bacterias del azufre secuenciadas fueron diferentes de las cepas que se habían sido cultivadas previamente (Casamayor et al., 2000).

Tanto los microorganismos cultivados, como aquellos de los que tan sólo ha sido identificada su secuencia, son componentes de la muestra y, con toda probabilidad, dada la diversidad microbiana, también lo son otros que no pueden ser identificados ni por uno ni por otro método.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la flora microbiana que se encuentra en un monumento es el resultado de la colonización sucesiva que ha tenido lugar a lo largo de los años. Los microorganismos colonizadores que constituyen la comunidad del biofilm primario del monumento, interaccionan con el sustrato y entre sí. En un primer momento se establecen relaciones, básicamente, de competencia por el sustrato. Esto es debido a que la capacidad de colonizar superficies proporciona a la bacteria ciertas ventajas: mejor acceso a los nutrientes; protección frente a toxinas como biocidas o metales pesados; protección frente a radiaciones; desarrollo y síntesis de enzimas que le capacitan para la degradación de contaminantes, etc.

**TABLA 2**  
Géneros identificados en pinturas murales

Géneros identificados	Técnicas microbiológicas			Técnicas moleculares		
	C	H	G	C	H	G
<i>Actinobispora</i>					+	
<i>Arthrobacter</i>	+	+	+		+	+
<i>Bacillus</i>	+	+	+			
<i>Brevibacillus</i>	+	+				
<i>Brevibacterium</i>	+	+				
<i>Cellulomonas</i>		+	+			
<i>Chromohalobacter</i>					+	
<i>Curtobacterium</i>		+				
<i>Cyclobacterium</i>						+
<i>Cytophaga</i>					+	
<i>Deleya</i>					+	
<i>Erythrobacter</i>						+
<i>Frankia</i>					+	+
<i>Geodermatophilus</i>					+	+
<i>Haloarchaeon</i>				+		
<i>Halococcus</i>				+		
<i>Halomonas</i>		+			+	
<i>Kocuria</i>	+	+	+			
<i>Methylobacterium</i>		+				
<i>Micrococcus</i>	+	+	+			
<i>Micromonospora</i>		+				
<i>Natronobacterium</i>				+		
<i>Paenibacillus</i>	+	+	+			
<i>Pseudomonas</i>		+	+		+	
<i>Pseudonocardia</i>					+	
<i>Promicromonospora</i>						+
<i>Rathayibacter</i>		+				
<i>Rhodotermus</i>					+	



<i>Rubrobacter</i>					+	
<i>Saccharopolyspora</i>					+	
<i>Salmonella</i>						+
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+			
<i>Streptomonospora</i>					+	
<i>Streptomyces</i>		+	+			
<i>Thermomicrobium</i>					+	

C: Carmona; H: Herberstein; G: Greene

Algunos estudios llevados a cabo en murales de iglesias medievales rusas han considerado a las especies del género *Arthrobacter* como las primeras colonizadoras de estas iglesias (Petushkova y Lyalikova, 1986).

Más tarde, por interacciones competitivas y sinérgicas entre algunas especies colonizadoras, así como por reclutamiento de especies nuevas y pérdida de algunas de las colonizadoras primarias, se forma la comunidad bacteriana que constituye el biofilm maduro del monumento. Habitualmente, estas interacciones favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos, tales como los que esporulan o los que producen metabolitos secundarios.

Estos últimos microorganismos han constituido la mayoría de los identificados mediante las técnicas microbiológicas, debido a que, aprovechando las características de los medios de cultivo empleados rutinariamente en el laboratorio, desarrollan un crecimiento muy rápido. Por el contrario, aquellas especies en las que concurren alguna o las dos características: poco representadas; representadas, pero de crecimiento lento y/o difíciles de cultivar en laboratorio; pudieran ser las detectadas mediante técnicas moleculares.

### **Géneros identificados en el sistema experimental para el estudio de muestras de monumentos mediante técnicas moleculares y microbiológicas**

Las identificaciones que se realizaron en el sistema experimental para el estudio de muestras de monumentos mediante análisis DGGE y MIDI (Tabla 3), han permitido la evaluación comparativa de la aplicación de técnicas moleculares y microbiológicas al estudio de las comunidades bacterianas de monumentos. A partir de la constatación y comparación de los datos obtenidos con ambos tipos de herramientas, se ha podido valorar convenientemente la eficacia del empleo de ellas, y si éste es mayor por separado o en conjunto.

La población microbiana del sistema experimental (Tabla 1), establecida en los tres distintos soportes, se analizó después de seis meses de crecimiento a 28°C mediante las dos aproximaciones objeto de estudio. Todos estos microorganismos son capaces de producir una serie de daños constatables en monumentos: tinciones, decoloraciones, pátinas, eflorescencias. *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina* y *Pseudomonas* son géneros aislados a partir de frescos y pinturas murales. En 1971, Lazar realizó en el laboratorio, con cultivos puros de estos microorganismos, un cultivo mezcla que fue transferido a pequeñas zonas no dañadas de las pinturas. A las 3-4 semanas de la inoculación, éstas presentaron áreas de tinción artificiales.

Es de destacar que los medios que contenían suplemento salino presentaron un mayor crecimiento de unidades formadoras de colonia que aquellos carentes de dicho suplemento, dato que concuerda con lo que se ha encontrado en los sistemas reales (Saiz-Jiménez y Laiz, 2000).

Por otra parte, dado que la flora microbiana que coloniza un monumento varía de acuerdo con su composición química, se comparó las poblaciones bacterianas que fueron identificadas en los sustratos de arenisca, caliza y mortero (Tabla 3 y Figura 2). Mediante análisis de DGGE, la población bacteriana identificada en la arenisca estaba compuesta por *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus luteus* y *Arthrobacter* spp. Cuando el sustrato tenía suplemento salino se identificaban, además de las anteriores, las especies *Halomonas halophila* y *Halococcus morrhuae*. En los medios de cultivo de laboratorio crecieron *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *Brevibacillus laterosporus* y *H. halophila*.

De igual forma, los análisis de DGGE mostraron que la población bacteriana identificada en el mortero estaba compuesta por *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *M. luteus* y *Arthrobacter* spp. En los medios de cultivo de laboratorio, crecieron *B. megaterium*, *B. pumilus*, y *A. histidinolovorans*.

En la caliza se identificaron *Arthrobacter histidinolovorans*, *H. halophila* y *H. morrhuae* utilizando análisis de DGGE. En los medios de cultivo de laboratorio crecieron *B. pumilus*, *B. laterosporus* y *H. halophila*.

Es de destacar que los sustratos de arenisca y mortero permitieron el crecimiento del mismo tipo de microorganismos, siendo la mayoría de las especies cultivables las pertenecientes al género *Bacillus*.

## **Detección de bacterias halófilas en el sistema experimental**



*Halomonas halophila* y *Halococcus morrhuae* necesitan para su crecimiento un medio de cultivo enriquecido en sal. Este suplemento salino fue proporcionado, en forma de cloruro sódico y sulfato de magnesio, con el medio de cultivo TSBS del sistema experimental. La evaluación de este sistema se llevó a cabo a los 6 meses de su inoculación, realizándose por separado para eubacterias y para *Archaea*.

En primer lugar, se extrajo el ADN ribosómico de las poblaciones bacterianas existentes en los distintos sustratos al fin del periodo. El ADN resultante se amplificó con los primers 341fGC y 518r y se analizó en DGGE.

La detección de *H. halophila* se realizó mediante análisis de DGGE utilizando un gradiente de desnaturalizantes de 30-50%. La Figura 2 muestra este análisis. En los carriles 5 y 6, que corresponden respectivamente a los sustratos de caliza y arenisca, ambos con suplemento salino, se observan las poblaciones en las que se detectó la banda correspondiente a *H. halophila* después de 6 meses de incubación. Asimismo, empleando medios de cultivo específicos para *Halomonas* spp. se consiguió cultivar *H. halophila* en el laboratorio a partir de dichos sustratos.

Para la detección de *H. morrhuae*, perteneciente al dominio *Archaea*, se llevó a cabo asimismo la evaluación del sistema experimental. Los ADNs ribosómicos extraídos de las poblaciones bacterianas se amplificaron con primers específicos de *Archaea* y se analizaron en DGGE utilizando un gradiente de desnaturalizantes de 30-50%. La Figura 3 muestra este análisis. La detección de la banda correspondiente a *H. morrhuae* en DGGE mostró una correspondencia perfecta con la detectada en las poblaciones existentes en soportes con suplemento salino al fin de la incubación. Sin embargo, no se logró cultivar *H. morrhuae* a pesar del empleo de medios de cultivo específicos para *Archaea*.

## **Características diferenciales y complementariedad de las técnicas**

Se ha visto cómo la aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S, permite enfocar el estudio de la comunidad bacteriana presente en monumentos desde un punto de vista diferente del de las técnicas microbiológicas tradicionales.

La primera característica diferencial de las dos técnicas (Tabla 4) es la cantidad de muestra requerida, ya que ésta es mucho menor en el caso de las técnicas moleculares. La segunda característica diferencial se refiere a la identificación de los microorganismos: mientras que las



técnicas moleculares identifican todos los microorganismos presentes en la muestra, las microbiológicas sólo permiten la identificación de unos pocos microorganismos fácilmente cultivables. La tercera característica diferencial es que las técnicas microbiológicas distinguen entre microorganismos vivos y muertos; las moleculares no.

**TABLA 4**

Características diferenciales de las técnicas moleculares y microbiológicas

	TÉCNICAS MOLECULARES	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS
CANTIDAD DE MUESTRA	Pequeña	Moderada
IDENTIFICACIÓN	Microorganismos cultivables y no cultivables	Microorganismos cultivables
DISCRIMINACIÓN	No	Microorganismos vivos - muertos

Por lo tanto, más que al abandono de las técnicas tradicionales, se debe tender a utilizar e incrementar las potencialidades de las dos técnicas. Así, las técnicas moleculares serían muy útiles para la ampliación de las bases de datos de los sistemas de identificación microbiana. De este modo, estas bases de datos se irían adaptando a cepas ambientales como las que se encuentran en las comunidades bacterianas de monumentos.

Por su parte, las técnicas microbiológicas, capacitarían para el diseño específico de medios de cultivo para llevar a cabo estudios fisiológicos con los microorganismos que se hayan secuenciado; ya que es necesario el cultivo de los microorganismos para conocer su metabolismo y poder así evaluar la capacidad de acción de los biocidas.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas a partir del sistema experimental diseñado en este estudio son:

1. La amplificación de los ADN ribosómicos 16S de los microorganismos presentes en monumentos no es total. Se ha descrito lisis ineficaz de las bacterias Gram-positivas que esporulan, entre las que se encuentran las pertenecientes al género *Bacillus*. Esto explicaría por qué no es siempre posible detectar mediante análisis de DGGE especies pertenecientes al género *Bacillus*, aún cuando es posible su aislamiento a partir de la misma muestra utilizando medios de cultivo convencionales de laboratorio.
2. El crecimiento de las bacterias en los distintos materiales fue diferente. Existen bacterias que no son demasiado abundantes en la población y por lo tanto no se amplificaría su ADN, sin embargo, aprovechando las características de los medios de cultivo empleados han sido capaces de crecer. Por el contrario, otras que fueron previamente detectadas en las muestras mediante análisis de DGGE, como es el caso de *H. morrhuae*, no pudieron ser aisladas, demostrando una vez más la dificultad existente para cultivar *Archaea*.
3. Los sustratos de arenisca y mortero permitieron el crecimiento del mismo tipo de bacterias, dando lugar al establecimiento de poblaciones microbianas prácticamente idénticas.
4. Los métodos moleculares han permitido la detección de microorganismos de crecimiento lento y/o fastidioso como el de *Archaea*.
5. La utilización conjunta de ambas metodologías, permitió obtener una imagen más exacta de las comunidades microbianas; ya que, si las técnicas moleculares dieron lugar a la identificación de las bacterias de crecimiento lento, las microbiológicas permitieron distinguir las especies del género *Bacillus*. Los resultados que se obtienen no son contradictorios ni excluyentes, sino complementarios.
6. Por último, aunque existe un gran número de publicaciones acerca del daño causado en monumentos, de los que se han aislado numerosos microorganismos, es necesario continuar este tipo de estudios para establecer mecanismos de acción general de éstos y su papel en el biodeterioro. También es necesario distinguir entre los realmente responsables del biodeterioro y aquellos que no juegan un papel tan directo en el proceso. En este sentido han de encaminarse los estudios futuros.

**Agradecimientos:** Esta investigación forma parte de las actividades desarrolladas dentro del Proyecto Europeo "Novel molecular tools for the analysis of unknown microbial communities of mural paintings and their implementation into the conservation/restoration practice" (ENV4-CT98-0705). El trabajo de G. Piñar ha sido financiado por una beca de la Comunidad Europea "Marie Curie" (BIO4-CT98-5057).

## BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jiménez, C. (1997) Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* **36**, 366-373.
- Berner, M., Warnner, G., Lubitz, W. (1997) A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the Castle Herberstein and in the parish church of St Georgen in Styria, Austria. *Int. Biodeter. Biodegr.* **40**, 53-61.
- Bianchi, A., Favali, M.A., Barbieri, N., Bassi, M. (1980) The use of fungicides on mold covered frescoes in San Eusebio in Pavia. *Int. Biodeter. Bull.* **16**, 45-51.
- Bock, E., Sand, W. (1993) The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 503-514.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedròs-Aliò, C., Muyzer, G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulphurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 499-508.
- DasSarma, S., Fleischmann, E.M., Rodríguez-Valera, F. (1995) Appendix 2. Media for halophiles. En: Robb, F.T. (ed.), *Archaea: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 225-230.
- De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Melgarejo, P., Saiz-Jiménez, C. (1991) Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Sci. Total Environ.* **107**, 159-168.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer C.L., Field, K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
- González, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C., Saiz-Jiménez, C. (1999) Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (South Spain) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 123-127.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetza, B., Schumann, P., Saiz-Jiménez, C. (1999) Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 115-122.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings J., Rölleke, S. (2000) Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int. Biodeter. Biodegr.* **46**, 229-239.



- Hof, T. (1935) Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Rev. Trav. Bot. Neerland* **32**, 92-171.
- Incerti, C., Blanco-Varela, M.T., Puertas, F., Saiz-Jiménez, C. (1997) Halotolerant and halophilic bacteria associated to efflorescences in Jerez cathedral. En: Zezza, F. (ed.), *Origin, Mechanisms and Effects of Salts on Degradation of Monuments in Marine and Continental Environments. Protection and Conservation of the European Cultural Heritage Research Report No. 4*, 225-232.
- Krumbein, W.E. (1988) Microbial interactions with mineral materials. En: Houghton, R., Smith, R., Eggins, H. (eds.), *Biodeterioration 7*. Elsevier, New York, p. 78.
- Laiz, L., Groth, I., González, I., Saiz-Jiménez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira Cave (Santillana del Mar, Spain) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 129-138.
- Laiz, L., Hermosin, H., Caballero, B., Saiz-Jiménez, C. (2000) Bacteria isolated from the rocks supporting prehistoric paintings in two shelters from Sierra de Cazorla, Jaen, Spain. *Aerobiologia* **16**, 119-124.
- Lazar, I. (1971) Investigations on the presence and role of bacteria in deteriorated zones of Cozia Monastery painting. *Rev. Roum. Biol. Ser. Bot.* **16**, 437-444.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M.Jr., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **27**, 171-173.
- Middendorf, L.R., Bruce, J.C., Bruce, R.C., Eckles, R.D., Grone, D.L., Roemer, S.C., Sloniker, G.D., Steffens, D.L., Sutter, S.L., Brumbaugh, J.A., Patonay, G. (1992) Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis* **13**, 487-494.
- Muyzer, G., de Waal E. C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., De Wachter, R. (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2237-2317.
- Petushkova, J.P., Lyalikova, N.N. (1986) Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Stud. Conserv.* **31**, 65-69.
- Piñar, G., Gurtner, C., Lubitz W., Rölleke, S. (2001) Identification of *Archaea* in objects of art by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis and shotgun cloning. *Methods Enzymol.* **336**, 356-366.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridisation probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1232-1240.

- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner G., Lubitz, W. (1996) Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.
- Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W. (1998) Medieval wall painting-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval wall painting. *Biodet. Biodeg.* **41**, 85-92.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2001) An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 77-87.
- Saiz-Jiménez, C. (1993). Deposition of airborne organic pollutants on historic building. *Atmos. Environ.* **27B**, 77-85.
- Saiz-Jiménez, C. (1994) Biodeterioration of stone in historic building and monuments, En: Llewellyn, G.C., Dashek, W.W., O'Read, C.E. (eds.), *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plants Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*. Plenum, New York, 587-603.
- Saiz-Jiménez, C. (1995) Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiologia* **11**, 161-175.
- Saiz-Jiménez, C. (1997) Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on to historic buildings. *Int. Biodeter. Biodegr.* **40**, 225-232.
- Saiz-Jiménez, C., Laiz, L. (2000) Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *Int. Biodeter. Biodegr.* **46**, 319-326.
- Santegoeds, C.M., Nold, S.C., Ward, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3922-3928.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tiano, P. (1993) Biodeterioration of stone monuments: a critical review. En: Garg, K.L., Garg, N., Mukerji, K.G. (eds.), *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 1. Naya Prokash, Calcutta, 173-203.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65

# SENSORES DE pH MEDIOAMBIENTAL APLICABLES EN LA CONSERVACION PREVENTIVA DE VIDRIOS HISTORICOS

M.A. Villegas<sup>1</sup>, M.A. García<sup>2</sup>, J. Llopis<sup>2</sup> y F.J. Alguacil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*CENIM Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Avda. Gregorio del Amo, 8. 28040 Madrid*

<sup>2</sup>*Facultad Ciencias Físicas. Universidad Complutense  
Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid*

## RESUMEN

Muchos de los materiales de objetos históricos se ven sometidos a la acción de ambientes ácidos, lo que repercute negativamente en su conservación. Un modo de controlar a priori la degradación que originan dichos ambientes es la evaluación in situ del pH ambiental mediante el uso de sensores. En el caso de piezas de vidrio y de vidrieras históricas el ataque por ácidos es muy severo. En el presente trabajo se han diseñado, preparado y caracterizado sensores de acidez ambiental, especialmente útiles y de fácil manejo, para el control preventivo de las condiciones ambientales de conservación del patrimonio vidriero.

**Palabras clave:** Sensores, acidez, vidrios, conservación, medioambiente, óptico.

## INTRODUCCION

Los vidrios históricos, tanto los que forman parte del patrimonio arquitectónico, caso de las vidrieras, como los diferentes objetos que se exhiben en los museos, presentan en su mayoría una composición química que los hace especialmente sensibles al ataque químico. En general, estos vidrios se fabricaron utilizando las materias primas disponibles y con los limitados medios de fusión que eran habituales en aquellas épocas. Por ello en el patrimonio vidriero es frecuente encontrar vidrios de silicato potásico cálcico que se caracterizan por ser poco resistentes al ataque químico, especialmente en ambientes húmedos, a diferencia de los vidrios de silicato sódico cálcico que son comparativamente bastante más estables (Fernández Navarro, 1996).

El patrimonio vidriero localizado en edificaciones, que se remonta a mediados del siglo X (catedral de Reims, Francia) (Fernández Navarro, 1985), empieza a deteriorarse prácticamente desde el momento de su colocación en el conjunto arquitectónico. Quizá son las vidrieras de las catedrales, iglesias u otros edificios las que han sufrido un mayor impacto debido a la acción de los diferentes contaminantes atmosféricos a lo largo



de siglos de exposición ininterrumpida. Por su parte los objetos de vidrio, tales como recipientes, cuentas y abalorios, adornos, etc. también han experimentado importantes cambios debido al deterioro que conlleva su frecuente enterramiento durante decenios o siglos.

El proceso de deterioro del patrimonio vidriero se ha visto acelerado de modo preocupante en los últimos 70 años. El desarrollo industrial hace que cada año se multipliquen las emisiones a la atmósfera y aparezcan nuevos contaminantes que sin duda amenazan seriamente a todo el patrimonio histórico-artístico si no se establecen medidas urgentes de protección y de conservación preventiva. En este sentido cabe señalar que no sólo corren peligro las obras de arte localizadas al aire libre, expuestas constantemente a la acción negativa de los cambios de temperatura, humedad y contaminantes; sino también los fondos vidrieros que se conservan en entornos museográficos. Frecuentemente se registran en el interior de los museos la presencia de contaminantes tan peligrosos o más aún que los contaminantes habituales en la atmósfera y que provienen de las emisiones de las maderas, de los adhesivos y sellantes utilizados en las vitrinas, de las condensaciones, de los productos de limpieza, de los microorganismos, etc. Además, no hay que olvidar que, desgraciadamente, en la mayoría de los casos, los ambientes de los entornos museográficos no están climatológicamente controlados, debido a la frecuente escasez de medios económicos, por lo que el patrimonio vidriero de interiores se ve sometido a la doble acción perjudicial de los contaminantes propios del entorno museográfico como de los atmosféricos.

Las nuevas tendencias hacia la conservación preventiva del patrimonio histórico en general, han llevado a considerar muy diversas metodologías orientadas hacia la protección de las obras de arte, en que se prevén cuáles son los agentes agresivos que pueden o podrían ser en un futuro los causantes de su progresivo deterioro. En una segunda etapa, el objetivo es idear un dispositivo capaz de evaluar o cuantificar los daños para, posteriormente, proceder a seleccionar los métodos y tecnologías más idóneas que eviten el deterioro. Finalmente y si es necesario, se analizan los posibles sistemas de protección activa que, preferiblemente, sean reversibles.

En el caso concreto del patrimonio vidriero, han de establecerse en primer lugar cuáles son las causas del deterioro existente mediante un estudio analítico de las piezas históricas. El estado de conservación de éstas indicará el tipo de ataque producido y cuál es el agente agresivo que lo ha provocado. Una vez reconocidas las causas del deterioro el planteamiento se dirige hacia cómo prever la presencia y acción de los contaminantes; esto es, la búsqueda de materiales, dispositivos, equipos, etc. que contribuyan de un modo eficaz a la conservación preventiva de la obra de arte vidriera. En esta fase se aplican frecuentemente nuevas

tecnologías que incluyen controladores y sensores de las condiciones medioambientales tanto para interiores museográficos como para exteriores. Los más frecuentemente utilizados son sistemas para control de la temperatura, humedad relativa, presencia de emisiones gaseosas (óxidos de carbono, de nitrógeno y de azufre) y en menor proporción para detección de microorganismos. En ocasiones es necesario proteger las piezas históricas ya deterioradas frente a ulteriores ataques. Para ello se utilizan capas protectoras aplicadas directamente sobre la superficie del vidrio histórico (Carmona *et al.*, 2000), o bien se disponen paneles de protección pasiva o exterior, como se viene realizando en el caso de las vidrieras de conjuntos arquitectónicos.

Como es bien conocido, el exceso de dióxido de azufre procedente de las combustiones de los motores, provoca junto con la humedad atmosférica lo que se conoce como lluvia ácida. El grado de acidez del vapor de agua en contacto con el dióxido de azufre es muy elevado y su pH corresponde al de una disolución de ácido sulfúrico que se forma en las pequeñas gotas de agua a las que da lugar. El efecto de esta lluvia ácida es especialmente agresivo para los vidrios de las vidrieras históricas, ya de por sí sometidas al gradual deterioro de los siglos, debido a que tienen una composición muy rica en óxido de potasio que los hace particularmente sensibles. Por otro lado, el patrimonio vidriero de interiores museográficos no corre mejor suerte, ya que frecuentemente se halla expuesto a las emisiones ácidas procedentes de muy variados productos químicos (ácidos fórmico y acético, aldehídos, disolventes orgánicos) que se utilizan en la fabricación de materiales usados en las vitrinas, paneles, solados, instalaciones luminosas y de seguridad, etc., así como a las procedentes de los productos de limpieza.

El control del grado de acidez o pH medioambiental ofrecería la ventaja de conocer de antemano el tipo de ataque que se va a provocar en el vidrio histórico y, en consecuencia, facilitaría las labores de conservación preventiva y, en su caso, de selección de protección activa o pasiva a aplicar (Villegas, 2000).

Los sensores de pH, objeto del presente trabajo, permiten evaluar cualitativamente el grado de acidez del ambiente mediante comparación del color que adquieren con el de una escala de color preestablecida; o bien, medir cuantitativamente el pH de la fase gaseosa en las inmediaciones de la obra de arte por simple registro del espectro de absorción visible del sensor, una vez expuesto y sensibilizado en dicho ambiente. Son, pues, sensores de respuesta óptica que informan del pH al que se está produciendo o se va a producir el ataque químico al que se someten los vidrios históricos por contacto con los contaminantes medioambientales, tanto de interiores como procedentes de la intemperie.



## ATAQUE QUIMICO DE LOS VIDRIOS

En general los vidrios presentan una elevada resistencia química. Sin embargo, en mayor o menor grado, se produce una interacción con los distintos agentes químicos con los que entra en contacto. Dependiendo de la composición del vidrio y de las características de la agresión química se producirá en aquel un cierto nivel de deterioro.

El ataque del agua a los vidrios se produce en varias etapas: en primer lugar se establece un intercambio de los iones alcalinos del vidrio (iones sodio o potasio) con los iones hidrógeno (medio ácido) procedentes del agua. El resultado de este ataque ácido es que se crean iones hidroxilo que quedan en la superficie del vidrio formando parte de los que se denominan grupos silanoles ( $\text{Si-OH}$ ). Esto da lugar a la aparición de una capa de tipo gelatinoso que permite la penetración del agua. Simultáneamente, los iones hidroxilos que quedan libres (medio básico o alcalino), tras la disociación del agua en iones hidrógeno e hidroxilo, provocan otro ataque en el vidrio que da lugar a la destrucción de la red vítrea, ya que rompe los enlaces siloxano entre los átomos de silicio y de oxígeno que la constituyen. Este tipo de ataque alcalino es aún más destructivo que el ataque en medio ácido, ya que provoca la aparición de más iones hidroxilos disociando nuevas moléculas de agua, con lo que el ataque al vidrio avanza hacia capas más profundas con la destrucción parcial de la red vítrea.

Por lo tanto, el pH del medio influye de un modo importante en el tipo y grado de ataque que va a experimentar el vidrio. Así, en medio ácido (pH entre 0 y 7) cuando la concentración de iones hidrógeno es elevada, el proceso de deterioro del vidrio se debe fundamentalmente a un proceso de intercambio con los iones alcalinos de éste que se pierden paulatinamente al ser extraídos (proceso de desalcalinización). En el caso concreto de los vidrios históricos, muy ricos en óxidos alcalinos (especialmente en óxido de potasio), el intercambio de los iones hidrógeno por los iones alcalinos es muy intenso y da lugar a alteraciones considerables de la red vítrea. El ataque a los vidrios históricos provocado por la humedad atmosférica enriquecida en dióxido de azufre se debe considerar a efectos prácticos como una corrosión debida a una disolución de ácido sulfúrico. Por otro lado, cuando el medioambiente se encuentra contaminado con agentes alcalinos (pH entre 7 y 14) el ataque que se induce en los vidrios es extremadamente agresivo y rápido, debido a que los iones hidroxilos determinantes de ese pH básico o alcalino dan lugar, como ya se ha indicado a una rotura de los enlaces constituyentes de la red del vidrio y, en consecuencia, su destrucción.

Desde el punto de vista de la composición del vidrio, es de suma importancia conocer cuál es la naturaleza y concentración del óxido u óxidos alcalinos presentes, ya que ambas tienen una gran influencia en la



resistencia química del vidrio. Así, a igualdad de concentraciones molares, la presencia de proporciones elevadas de óxido de potasio en lugar de otros óxidos alcalinos como los de sodio y de litio, representa un factor de riesgo en la durabilidad del vidrio, ya que lo hace mucho más vulnerable a la acción de los agentes químicos. Por ejemplo, los vidrios con un contenido mayor al 20 % molar de óxido de potasio presentan una gran tendencia a la atacabilidad, pues su estructura reticular es mucho más abierta que en el caso de los otros óxidos alcalinos, esto se debe a la distorsión geométrica que originan los iones potasio por su mayor tamaño.

La presencia de óxidos alcalinotérreos (por ejemplo, de calcio) en los vidrios mejora sustancialmente su resistencia química, ya que, en este caso, los iones divalentes refuerzan la red del vidrio impidiendo el intercambio entre los iones hidrógeno y los iones alcalinos. El parámetro que resulta más práctico y fácil de manejar es la relación de la concentración de óxido alcalinotérreo a la concentración de óxido alcalino (concretamente  $[CaO]/[K_2O]$ ). En muchos de los vidrios procedentes de vidrieras históricas esta relación es menor que 2, lo que lleva implícito que la proporción de óxido de calcio no es la suficiente para garantizar una buena resistencia química, habida cuenta de la elevada concentración de óxido de potasio que suele estar presente en los mencionados vidrios históricos (Carmona *et al.*, 2000).

Como consecuencia del ataque químico, se forman en la superficie de los vidrios distintas sales como carbonatos, nitratos o sulfatos, que quedan depositadas formando costras de una composición correspondiente a la de las sales más insolubles (sulfatos). Dichas costras pueden, por otro lado, ser el medio adecuado para el asentamiento y proliferación de colonias de microorganismos que acentuarán el deterioro de la pieza de vidrio.

## **SENSORES OPTICOS DEL pH MEDIOAMBIENTAL**

### **Preparación**

La preparación de sensores ópticos de pH conlleva una serie de condicionantes que se derivan de las necesidades anteriormente expuestas en relación con la conservación preventiva de los objetos históricos de vidrio.

Por un lado es necesario controlar el pH del ambiente en el que se ubican las obras de arte y, por otro, se requiere que la metodología a desarrollar sea precisa y a la vez de utilización sencilla; esto es, libre de los condicionantes inherentes al uso de equipos sofisticados, de gran tamaño o simplemente que necesiten alimentación eléctrica. Es por ello por lo que el planteamiento se orienta hacia la preparación de un sensor de pequeño tamaño, de manejo manual en la medida de lo posible, y de

evaluación visual rápida y fiable. Otros condicionantes secundarios se refieren a la durabilidad del sensor frente a las posibles agresiones tanto de la intemperie como de los microambientes de interiores de entornos museográficos. Esto supone que el material que constituya el sensor ha de ser resistente a la humedad ambiental, a las condensaciones, a los cambios de temperatura y a la manipulación; y en cualquier caso, fácilmente sustituible por otro.

Los sensores de pH, objeto del presente trabajo, consisten en una delgada capa depositada por el procedimiento sol-gel sobre una pequeña pieza de vidrio común sódico cálcico. Dicha capa se obtiene mediante la preparación de una suspensión coloidal (sol) que contiene dos componentes principales: una mezcla de alcóxidos de silicio (tetraetóxido de silicio y metiltrietóxido de silicio) que aportan una matriz amorfa de óxido de silicio (sílice) y un dopante orgánico (amarillo de dimetilo) capaz de cambiar de color cuando se produce una variación del pH. La matriz de sílice pura garantiza una excelente durabilidad química para el sensor (Villegas, 2001). La selección del dopante orgánico se realiza de acuerdo con el intervalo de pH en el que se producen los cambios de acidez en el medioambiente al que está sometida la pieza de vidrio histórico. En este caso el colorante seleccionado varía su absorción óptica en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 4, ya que se considera como la acidez límite a partir de la cual el ataque ácido que sufren los vidrios resulta muy agresivo para su integridad. En el sol o suspensión coloidal también se añade un disolvente (etanol, normalmente) y un catalizador (un ácido mineral) que facilita la hidrólisis de los alcóxidos de silicio y la homogeneidad del sol.

Una vez preparado el sol, la pequeña pieza de vidrio común a recubrir se sumerge en él y a continuación se extrae a una velocidad de unos 20 cm/min. De este modo se forma una delgada capa de sol (de unos 300 nm de espesor) en la superficie del vidrio común al cual queda adherida. Posteriormente este sistema formado por el vidrio común o sustrato y el sol depositado (capa o recubrimiento) se seca a temperatura ambiente y forma lo que se denomina un gel. Este gel posee una estructura de tipo vítreo, amorfa a la difracción de rayos X. Esta característica de los sensores se mantiene después del tratamiento térmico de densificación parcial del gel que se lleva a cabo durante unos tres días a 60°C. El hecho de que el material que constituye el sensor, esto es el recubrimiento dopado de tipo vítreo, se densifique a 60°C garantiza su estabilidad para ser utilizado hasta dicha temperatura sin alteración de sus propiedades. Por otro lado, el sensor se sometió ininterrumpidamente a una temperatura baja (-5°C) durante más de tres meses para comprobar su resistencia a la escarcha y a las condensaciones. La comparación de la sensibilidad frente al pH antes y después del mencionado tratamiento demostró la capacidad del sensor para ser utilizado bajo condiciones térmicas extremas a aire libre.



Los recubrimientos sensores preparados son transparentes y presentan la coloración correspondiente a la del colorante orgánico con que fueron dopados. Dicho color es el que cambia con las variaciones de pH.

### **Caracterización fisicoquímica**

Los cambios de color que experimentan los sensores en función del pH se analizaron por espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) con un equipo Perkin-Elmer Lambda 9 y con un Shimadzu 3100, en el intervalo de longitudes de onda de 800 a 200 nm.

La durabilidad química de los recubrimientos sensores se evaluó mediante ensayos de resistencia hidrolítica. Para ello las muestras se sumergieron en contenedores de teflón con agua destilada a temperatura ambiente durante distintos periodos y se registraron los correspondientes espectros de absorción.

Desde el punto de vista mecánico, la resistencia a la manipulación, rayado y despegado se estudió de un modo globalizado mediante ciclos de lavado con un detergente abrasivo de pH fuertemente alcalino en una máquina lavavajillas convencional.

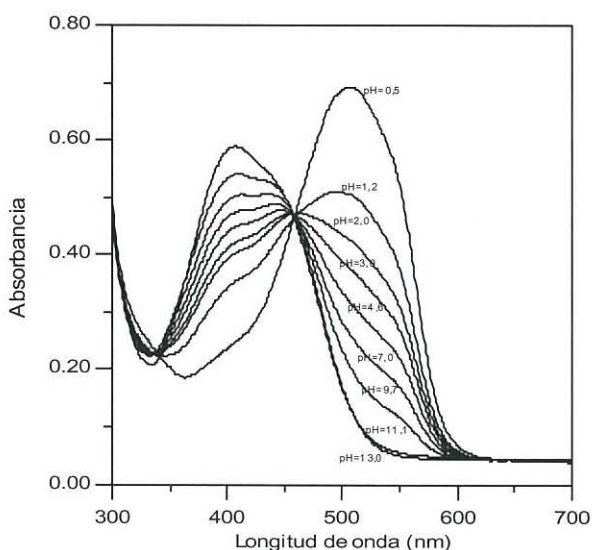
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el fin de estudiar el comportamiento óptico del sensor dopado con amarillo de dimetilo, se llevaron a cabo una serie de ensayos orientados a registrar sus espectros de absorción para distintos pH. La sensibilización del sensor se realizó en fase líquida a fin de maximizar las intensidades de las bandas de absorción y los posibles daños que el sensor pudiera sufrir durante su exposición. Para ello el sensor se introdujo sucesivamente durante 5 min en disoluciones tamponadas de diferente pH. A continuación se extrajo y se secó con un papel suave antes de introducirlo en el espectrofotómetro. Las bandas de absorción que se registraron coinciden con las que se producen cuando el sensor se sensibiliza en aire o, en general, en una fase gaseosa para los distintos pH probados. Los cambios de color que experimenta el sensor son reversibles. Esto quiere decir que un mismo sensor puede ser utilizado muchas veces sin que se observe degradación de su sensibilidad frente al pH, además de que pueda usarse de modo continuo para evaluar cambios dinámicos de la acidez. Se comprobó cualitativamente que un mismo sensor es capaz de sensibilizarse más de 50 ciclos sucesivos de pH ácido a pH básico y viceversa sin presentar fatiga.

En la Figura 1 se recogen los espectros de absorción óptica del sensor preparado para distintos valores de pH. Debido a la complejidad de las bandas registradas se realizó su deconvolución en componentes



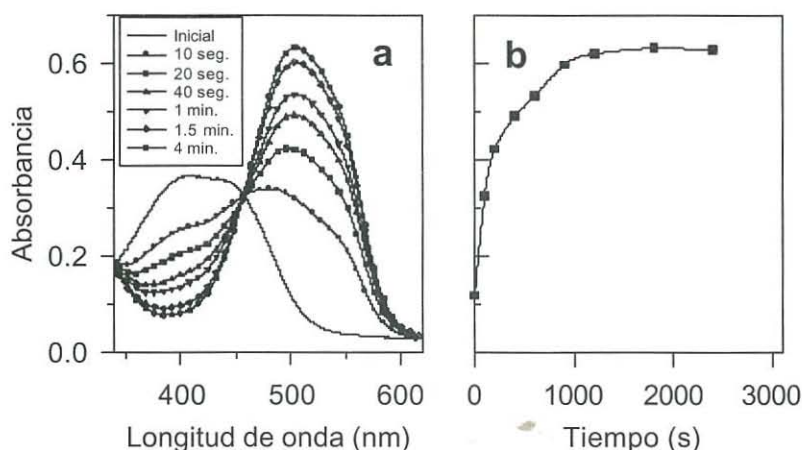
Gaussianas, en correspondencia con las bandas de absorción del amarillo de dimetilo cuando se encuentra en una disolución. De este modo se pudieron asignar las siguientes componentes espectrales: las bandas características para los pH ácidos aparecen a 508 y 550 nm, mientras que la de los pH básicos lo hace a 400 nm. Por otro lado, se registró una componente a 460 nm que está presente en todos los espectros para todos los pH. Dicha componente se ha relacionado con aquellas moléculas de amarillo de dimetilo que se encuentran localizadas en las zonas o poros menos asequibles al reactivo (disolución tamponada en la que se introduce el sensor) de un determinado pH, y que no son capaces de sensibilizarse por no poder entrar en contacto con él. La intensidad de las bandas características a pH ácido decrece hasta  $\text{pH}=4,64$ , para el cual las bandas características a pH básico son las dominantes. Las bandas ácidas a 508 y 550 nm desaparecen prácticamente a  $\text{pH}=10$ .



**Figura 1:** Espectros de absorción óptica del sensor dopado con amarillo de dimetilo para diferentes pH.

La respuesta óptica del sensor se analizó mediante el registro de sucesivos espectros después de sumergirlo en una disolución a pH=7,00 (espectro inicial) y después en una disolución a pH=0,50 durante 10 s (segundo espectro). Posteriormente, el sensor se introdujo otra vez en la disolución a pH=7,00 y después en la disolución ácida durante 20 s; y los siguientes ciclos 40 s, 1 min, 1,5 min y 4 min. En la Figura 2 a se han recogido los correspondientes espectros y en la Figura 2 b se han

sseleccionado las intensidades de la componente característica a pH ácido a 508 nm y se han representado en función de los tiempos de inmersión en la disolución ácida partiendo de la disolución a pH=7,00. Los tiempos de respuesta de la Figura 2 b indican que después de 1 min de inmersión, por ejemplo, la absorción óptica del sensor desde condiciones neutras a ácidas cambia alrededor de  $\Delta A \approx 0,43$ , lo que representa un nivel de sensibilidad muy considerable. Por otro lado, se puede apreciar que el



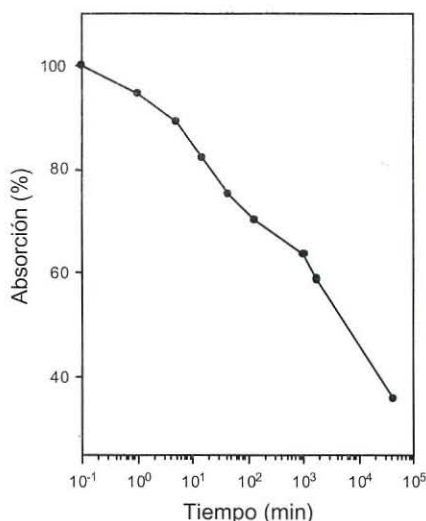
**Figura 2:** Espectros de absorción óptica y tiempo de respuesta del sensor cuando, partiendo de un pH neutro, se sensibiliza a pH ácido durante distintos periodos de tiempo.

sensor necesita un tiempo relativamente breve (200 s) para estabilizar su absorción óptica cuando cambia de pH neutro a ácido. Esto supone que los cambios de color que se producen cuando el pH se desplaza hacia valores más ácidos ocurren rápidamente y con una variación de la intensidad y de la tonalidad visualmente perceptibles.

El comportamiento del sensor permite deducir que las moléculas del colorante orgánico se encuentran atrapadas en la red pseudovítrea del gel que forma el recubrimiento de modo que, en su mayoría, se localizan en poros o en zonas superficiales que pueden entrar en contacto fácilmente con los reactivos ácidos y básicos (iones hidrógeno e iones hidroxilo) de

un medio externo acuoso (fase líquida) o húmedo (fase gaseosa) (Villegas *et al.* 2000).

En la Figura 3 se muestra la disminución que experimenta la componente de 508 nm característica para pH ácido después de varios ensayos acumulativos de resistencia hidrolítica del sensor. Los correspondientes espectros UV-VIS demostraron que no se producen desplazamientos de las bandas después de dichos ensayos sino sólo una caída de la intensidad de la componente de absorción a 508 nm. La primera etapa del ataque hidrolítico se extiende hasta unos 100 s en que la pérdida de intensidad de absorción se puede atribuir a la extracción de las moléculas de dopante localizadas en las zonas más superficiales del recubrimiento y cuyos débiles enlaces con la red pseudovítrea son más fáciles de romper. En una segunda etapa la extracción del colorante orgánico se produce más lentamente por lo que, este tramo puede deberse a la contribución de las moléculas de amarillo de dimetilo situadas en los poros parcialmente abiertos y en zonas más internas del recubrimiento. Los resultados obtenidos indican que después de 1000 s (unos 17 min) de inmersión en agua destilada, el sensor ha perdido alrededor de un 30% de su absorción óptica inicial. Si bien este porcentaje parece muy elevado hay que tener en cuenta que el ensayo se ha llevado a cabo por inmersión en una fase líquida y de modo acumulativo, por lo que las condiciones de ataque han sido muy agresivas desde el punto de vista de una extracción hidrolítica que, por otro lado, nunca llegaría a producirse en el caso de una sensibilización del sensor en fase gaseosa.

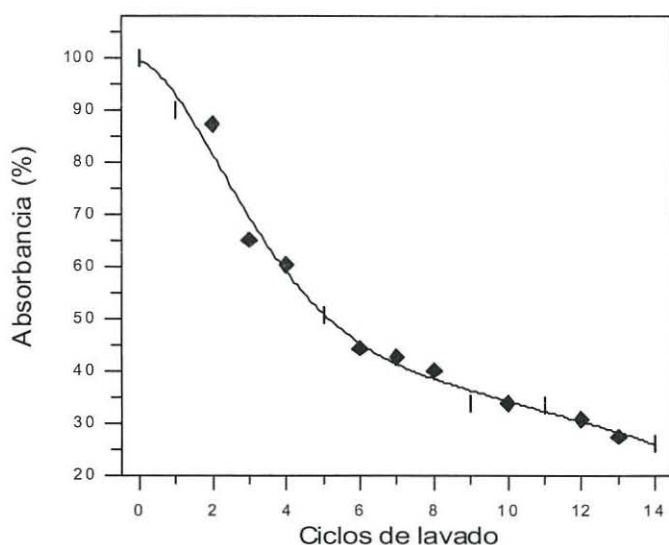


**Figura 3.** Pérdida de intensidad de absorción del sensor después de los ensayos de resistencia hidrolítica.



No obstante, hasta después de 100000 s (unas 28 h) la intensidad de la absorción óptica no alcanza valores menores del 50% inicial que, para una apreciación visual, ya supondrían una disminución importante de la coloración.

La Figura 4 presenta los resultados obtenidos para la disminución de intensidad de la componente de 508 nm (característica a pH ácido) tras los ciclos de lavado. Estos se llevaron a cabo con un detergente de pH muy básico y por esta razón este tipo de ensayos no sólo supone una agresión física al sensor debido al carácter abrasivo del detergente, sino también un ataque alcalino por el pH que adquiere aquel en medio acuoso. No obstante, no se observó en ningún momento la aparición de grietas, rayaduras o delaminaciones en la superficie del sensor. Los resultados de la Figura 4 ponen de manifiesto una degradación progresiva de la absorción óptica del sensor. Esta se produce primeramente de un modo relativamente abrupto durante los 6 primeros ciclos de lavado, lo que se corresponde con la extracción del dopante atrapado en poros en las capas superficiales (pérdida de absorbancia de hasta un 60 %). Posteriormente la degradación se lleva a cabo paulatinamente y como consecuencia se produce una disminución de la absorción del sensor debida a la extracción de las moléculas del dopante de las zonas más internas del recubrimiento (pérdida de hasta un 80 % de absorbancia).



**Figura 4:** Pérdida de intensidad de absorción del sensor después de los ciclos de lavado con detergente abrasivo.

## Funcionamiento del sensor

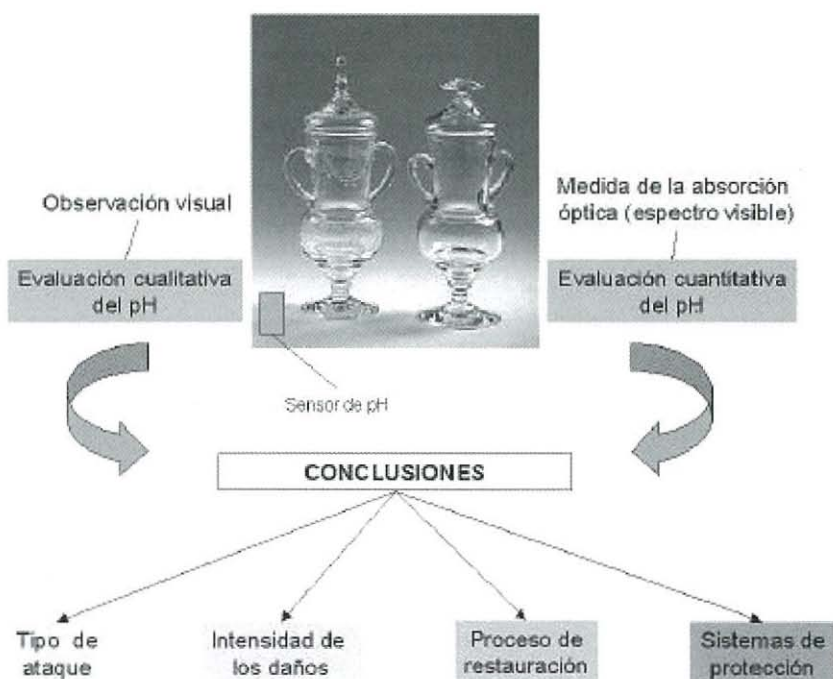
El esquema de funcionamiento del sensor de pH ambiental se recoge en la Figura 5. En las aplicaciones de conservación preventiva de obras de vidrio del patrimonio histórico-artístico, el sensor de pH se colocaría cerca del objeto cuyo pH ambiental se desea controlar o bien en el interior de la vitrina donde se exhibe dicho objeto. El sensor se habrá introducido previamente en agua destilada o en un tampón de pH=7 con lo que adoptará la coloración correspondiente a ese pH. Una vez dispuesto el sensor cerca del objeto basta con una observación visual durante los primeros minutos para que se produzca un cambio de color o de intensidad de la coloración, en el caso de que el pH del ambiente sea distinto de 7. El nuevo color del sensor se puede comparar en una escala de color previamente establecida y que, en el caso del dopante amarillo de dimetilo, comprendería en sus extremos el rosa intenso y el amarillo. Para  $\text{pH} < 3$  el color sería rosa intenso y para  $\text{pH} > 5$  sería amarillo. Para los valores de pH comprendidos entre 3 y 5 se tendrían colores de la gama del rosa pálido, salmón, anaranjado, amarillo pálido, etc. Desde el punto de vista cualitativo, la aparición de un color rosado o anaranjado ya sería suficiente para indicar que el pH medioambiental es ácido o que progresivamente se hace más ácido respecto a las condiciones iniciales.

Otro modo de controlar el pH medioambiental con este tipo de sensor sería registrar con un espectrofotómetro la absorción óptica del sensor una vez sensibilizado y comparar dicho valor con una curva de calibrado previamente establecida con patrones. La determinación del pH en este caso sería semicuantitativa y, por lo tanto, más precisa que en el caso anterior.

## CONCLUSIONES

Se ha preparado un sensor de pH de pequeño tamaño, reversible y estable a cualquier pH característico de los agentes químicos y de limpieza utilizados. Dicho sensor medioambiental resulta muy práctico y duradero para la realización de medidas cualitativas al aire libre o en aquellos entornos en los que no se pueden instalar equipos con cables o pilas. Por otro lado su utilización es tan sencilla como puede serlo una simple observación visual; con la ventaja de que los cambios dinámicos de pH que se produzcan en el tiempo sensibilizarían sucesivamente al sensor, sin fatiga ni desgaste alguno.

**Agradecimientos:** Al Prof. Dr. C. Sáiz Jiménez. A CE-FEDER-CICYT y DGES por la financiación de los proyectos 2FD97-0141 y PB97-0287.



**Figura 5:** Esquema del funcionamiento del sensor en un entorno museográfico.

## BIBLIOGRAFIA

- Fernández Navarro, J.M. (1996) Procesos de alteración de las vidrieras medievales. Estudio y tratamientos de protección. *Mat. Constr.* **46** (242-243), 5-25.
- Fernández Navarro, J.M. (1985) *El Vidrio*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Carmona, N., Villegas, M.A., Fernández Navarro, J.M. (2000) Vidrieras históricas: restauración y conservación. Actas del II Congr. Int. "Restaurar la Memoria" AR&PA 2000. Valladolid.
- Villegas, M.A. (2000) Indicadores cromáticos de acidez ambiental. En: *Jornadas Nacionales sobre Restauración y Conservación de Vidrios*. La Granja de San Ildefonso. Fundación Centro Nacional del Vidrio, La Granja de San Ildefonso, 145-159.
- Villegas, M.A. (2001) Chemical and microstructural characterization of sol-gel coatings in the zirconia-silica system. *Thin Solid Films* **382**, 124-132.



Villegas, M.A., Pascual, L., Paje, S.E., García, M.A., Llopis, J. (2000) Eriochrome cyanine doped sol-gel coatings. Optical behaviour against pH. *J. Eur. Ceram. Soc.* **20**, 1621-1628.

# COLONIZACIÓN DE MONUMENTOS Y CONSTRUCCIONES PÉTREAS POR LOS LÍQUENES. ESTUDIOS REALIZADOS EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

**Xavier Ariño Vila y Antonio Gómez-Bolea**

*Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia,  
Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona,  
E-mail: agomez@porthos.bio.ub.es*

## RESUMEN

Se analizan los factores biológicos de los líquenes que afectan a la colonización de los sustratos pétreos y también los factores abióticos como las características físico-químicas del sustrato y el microclima. Se comentan las alteraciones que los líquenes producen sobre los sustratos pétreos, y que son consideradas como responsables del deterioro de los mismos. Se presenta el estado actual del conocimiento sobre este tema en la Península Ibérica y se citan los principales equipos y trabajos realizados.

**Palabras clave:** biodeterioro, líquenes, sustratos pétreos, Península ibérica.

*Ai grandi cataclismi cosmici, alle guerre, alle devastazioni (cause distruttive rapide, irreparabili) si associano altre infinite piccole cause agenti di più lenta ma di più sicura distruzione. ("I licheni e la malattia delle vetrate antiche", Mattiolo 1928)*

## INTRODUCCIÓN

Los materiales utilizados para la construcción de monumentos, cuando se exponen al medio natural, son rápidamente colonizados por diversos organismos como las bacterias, las algas, los hongos y los líquenes, entre los más habituales. Como resultado de la colonización, la superficie del sustrato pasa a formar parte de los ciclos biogeoquímicos, mediante los cuales una parte de los elementos minerales retenidos en los materiales pétreos vuelven a participar de forma activa en los ciclos naturales. Este proceso, considerado beneficioso a escala global, se convierte en poco deseable cuando los materiales forman parte del legado histórico o cultural.

En la presente revisión nos vamos a referir a la colonización por los líquenes, asociación simbiótica de hongos y algas, que tienen la capacidad de crecer sobre la superficie de las rocas, en los ambientes aparentemente más inhóspitos donde no encuentran competencia. Ello los convierte en organismos pioneros en la colonización, no solamente

de las rocas, sino también de los materiales pétreos que forman parte de edificios y monumentos.

### ***Colonización de los sustratos pétreos por líquenes***

La colonización es un proceso que implica la capacidad de un sustrato de albergar a los organismos, y que se desarrollen y multipliquen, excluyendo por tanto, los organismos transeúntes o fortuitos. En los últimos años, se ha introducido el concepto de biorreceptividad para expresar la aptitud de un material a ser colonizado (Guillitte, 1995).

Asimismo, la colonización de un sustrato conlleva generalmente un proceso de sucesión en el tiempo por la ocupación del mismo espacio. Podríamos decir que los organismos más rápidos y más omnipresentes, como son las bacterias, se instalan primero y luego se van instalando y desarrollando otros organismos de ciclo más lento que entran en competencia con las bacterias a las que pueden llegar a desplazar y así sucesivamente. De esta forma se produce lo que algunos científicos denominan una sucesión primaria. En esta sucesión, como fruto de la meteorización de la roca madre y de la actividad de los micro y macroorganismos, se llega a la formación de un suelo bien desarrollado que puede mantener comunidades de plantas vasculares.

En el caso que nos ocupa, los líquenes desarrollan sus talos sobre sustratos pétreos, en general, como parte de un proceso de sucesión. El sustrato, primero, es colonizado por las bacterias, organismos que podemos considerar como los más ubicuistas, con un ciclo vital corto. Esta primera colonización, que muchas veces pasa desapercibida, es la base sobre la que los líquenes asientan sus talos.

No queda muy claro si la presencia de las bacterias y los cianoprocariotas es un requisito imprescindible para el establecimiento de algunos líquenes, si sólo sirve para facilitar la colonización por líquenes o si es indiferente para los líquenes. Hay muy poca información al respecto y sólo Poelt y Mayrhofer (1988) se fijan en algunos líquenes terrícolas y saxícolas que conviven con cianoprocariotas y definen esta relación como una cianotrofia que para algunos líquenes es facultativa como es el caso de varias especies del género *Candelariella*, para otros es obligada como sucede con algunas especies del género *Toninia* y por último proponen un grupo intermedio con cianotrofia facultativa-obligada en el que ubican varias especies del género *Bryonora*. Se necesita estudiar las interrelaciones entre las comunidades de bacterias o cianoprocariotas y los líquenes, desde el punto de vista fisiológico para comprender los primeros estadios de la colonización de los sustratos pétreos por los líquenes. Preguntas como ¿utiliza el líquen compuestos nitrogenados sintetizados por cianoprocariotas a partir del



nitrógeno atmosférico que pueden fijar? o ¿son las bacterias y cianoprocariotas un simple aporte de materia orgánica para el micobionte de la simbiosis líquénica?. Sólo un profundo conocimiento de estas interrelaciones nos permitirá proponer actuaciones racionales para controlar el crecimiento de los líquenes.

## **Factores bióticos que afectan a la colonización de los substratos pétreos por líquenes**

A continuación comentamos las características biológicas de los líquenes que tienen importancia e influyen de forma decisiva en los primeros estadios de la colonización.

### ***Las diásporas***

Las diásporas son las unidades morfológicas, de origen sexual o asexual, que sirven para la dispersión y por consiguiente, permiten a los líquenes colonizar nuevos espacios (Armstrong, 1988).

En algunos líquenes no se producen, o diferencian, unidades específicas para la dispersión de los talos. Así sucede con algunos líquenes, principalmente terrícolas con talo fruticuloso, en los que se produce fragmentación del talo, generalmente por acción mecánica, y son esos fragmentos transportados por animales o por el viento los que dispersan al organismo.

Los líquenes presentan una gran diversidad de diásporas. Unas diásporas como los conidios, los soredios o los isidios tienen un origen asexual y otras como las ascósporas tienen un origen sexual.

Los conidios, que en la mayoría de ocasiones se forman dentro de unas estructuras de forma más o menos globosas llamadas picnidios, se ha comprobado que pueden llegar a germinar y formar micelios en condiciones de laboratorio (Hawksworth, 1988). Su tamaño es muy variable y va desde los más pequeños de  $1 \times 0,5 \mu\text{m}$  hasta los  $100 \times 1,5\text{-}2 \mu\text{m}$ . No se conoce con exactitud su función en la naturaleza, y se ha especulado en base al tamaño si pueden actuar los más pequeños como espermacios en la reproducción sexual, o si los más grandes pueden llegar a germinar y formar nuevos talos líquénicos después de capturar las algas simbioses compatibles en la naturaleza (Hawksworth, 1988).

Los soredios son unidades, de forma más o menos globosa, constituidas por una o unas pocas células algales envueltas por hifas del hongo. Pueden formarse de forma más o menos difusa sobre la superficie del talo del liquen, y entonces le confieren un aspecto pulverulento o farinoso a su superficie o bien de forma discreta en unas discontinuidades del córtex que reciben el nombre de soralios. Este tipo

de diásporas debido a su carácter hidrófobo pensamos que pueden ser dispersadas por una acción combinada de impacto de las gotas de lluvia con el viento. Su tamaño va de 12 a 70  $\mu\text{m}$ . Este tipo de diásporas incorpora los dos biontes implicados en la formación del talo líquénico, lo que a priori parece una ventaja para la colonización, pero no hay la diferenciación en capas (córtez, medula y capa algal) característica de los talos de la mayoría de líquenes.

Los isidios son las diásporas más complejas, ya que en realidad son como un microtalo líquénico, en el que los dos biontes ya aparecen estructurados en capas. Son de mayor tamaño que los soredios ya que pueden medir milímetros. Relativamente poco se conoce sobre los vectores de dispersión implicados y su importancia relativa para los líquenes en general (Bailey, 1976), y en particular también en lo referente a los isidios.

En el caso de que los líquenes se reproduzcan sexualmente, es el hongo el que se reproduce, y para ello forma meiósporas. Según sea el micobionte un ascomicete o un basidiomicete esas meiósporas se denominan ascósporas o basidiósporas. En la mayoría de líquenes, casi un 98% el micobionte es un ascomicete y sólo en un 0,4% del total de líquenes conocidos, se trata de un basidiomicete (Honegger, 1996). Las ascósporas presentan una gran diversidad de formas y tamaños. Desde 1  $\mu\text{m}$ , o aún menores, hasta 500  $\mu\text{m}$ . Se trata por tanto de diásporas de pequeño tamaño y ligeras, que pueden fácilmente ser transportadas por el viento, el agua o los animales. El problema es que tienen que encontrar las algas que necesitan para formar el liquen. Sólo unas pocas especies de líquenes (por ejemplo los géneros *Staurothele* y *Endocarpon*) tienen en el himenio, algas preparadas para ser arrastradas por las ascósporas al salir del asco. La gran mayoría de líquenes que forman ascósporas han de encontrar un fotobionte compatible para formar el liquen y esto lo hacen capturando algas libres o algunos líquenes se forman como resultado de una invasión de otro liquen en el que el micobionte es reemplazado por el nuevo hongo que se adueñará de las algas que tenía el primitivo liquen, ocurre en algunas especies de los géneros *Dirina*, *Diploschistes* o *Pertusaria* entre otros.

Hay muchos líquenes que forman simultáneamente diásporas de tipo sexual y de tipo asexual. En estos casos parece que podemos interpretar una doble estrategia que pretende por un lado, con las ascósporas (reproducción sexual), alcanzar nuevos espacios por colonizar a grandes distancias y, por otro lado, una vez formado el nuevo talo los soredios o isidios le permitirían ampliar la superficie de colonización a corta distancia. Incluso se ha comprobado que los talos incipientes procedentes de soredios o isidios próximos, pueden llegar a fusionarse (Schuster *et al.* 1985).



## ***La germinación***

En el caso de los conidios y las acósporas, es necesaria la germinación para desarrollar las hifas que capturarán las algas y formarán el micelio para constituir un nuevo líquen.

No conocemos datos sobre este fenómeno en la naturaleza y la información que tenemos procede de experimentos realizados en condiciones de laboratorio. Las esporas de muchas especies liquénicas no se han podido hacer germinar en condiciones de laboratorio. Ahmadjian (1993) considera que no se ha podido conseguir hacer germinar las esporas de aproximadamente el 50% de los líquenes ensayados. Solo de unos pocos líquenes conocemos la germinación de las esporas y sabemos que responden, a diferencias de pH, de temperatura, de concentración de oxígeno y de contaminantes atmosféricos como el dióxido de azufre, de forma diferente según las especies. En general se sabe muy poco sobre los diferentes factores que estimulan o inhiben la germinación de las esporas.

## **Factores abióticos que afectan a la colonización de los substratos pétreos por líquenes**

A pesar de que los factores que afectan a la colonización de un substrato por líquenes no pueden aislarse, pues todos intervienen conjuntamente, los dividimos en dos grandes grupos: los relativos al substrato donde se desarrolla el talo, y los relativos al entorno inmediato, el microclima.

### ***Características físico-químicas del substrato***

Las características físicas y químicas del substrato también condicionan el establecimiento de las comunidades de líquenes. Las superficies rugosas proporcionan mejores lugares para que se instalen y crezcan las diásporas. Dureza, propiedades hídricas, composición mineral, pH, etc. son factores que tienen considerable peso específico en la selección de las especies y consecuentemente en la composición de las comunidades liquénicas. De hecho, las comunidades saxícolas (especializadas en colonizar las rocas) presentan una composición específica muy distinta si colonizan rocas carbonatadas (comunidades calcícolas), o si colonizan rocas ácidas (comunidades silícícolas), y estas dos son distintas a las que se originan en las zonas con acumulación de partículas de suelo o musgos, donde se desarrollan las comunidades terrícolas o muscícolas, respectivamente.



En morteros de zonas arqueológicas del sur de la Península Ibérica, se ha comprobado que pequeñas variaciones en la composición de minerales (que repercuten en la granulometría y porosidad, no en el pH), influyen notablemente en la composición florística y en la morfología de las especies (Ariño *et al.* 1997). En definitiva, los resultados parecen confirmar que, dentro de unas mismas condiciones microclimáticas, las características físicas del sustrato, generalmente consideradas de menor importancia que las químicas, son fundamentales en la selección de los taxones colonizadores. La dureza, así como su capacidad de retención de humedad, determina la composición de la comunidad de líquenes que se desarrolla (Roux, 1981; Deruelle, 1988), lo cual puede ser indicador del grado de alteración de la piedra (Ariño *et al.* 1995).

En cualquier caso, el hecho de que muchos taxones de líquenes vayan ligados a un tipo determinado de sustrato, resulta interesante como factor que puede incrementar la diversidad natural de líquenes de una zona, ya que los monumentos y áreas arqueológicas suelen contener una amplia gama de sustratos, frecuentemente alóctonos, donde se instala una variada flora con especies que de otra manera estarían ausentes provocando un incremento de la biodiversidad (Nimis *et al.* 1992; Ariño y Saiz-Jiménez, 1996a). Este hecho ya quedó patente en los trabajos de Bouly de Lesdain (1905, 1921), quien fue posiblemente, el primer autor en ponerlo en evidencia al realizar una descripción exhaustiva de la flora de líquenes de los Jardines de Versailles (París, Francia).

### **Microclima**

Si las características del sustrato son importantes, no lo son menos las condiciones microclimáticas. Los líquenes presentan, en general, una alta especificidad en cuanto a las condiciones ecológicas, y su distribución se halla determinada en gran medida por los parámetros microclimáticos. Debido a esta especificidad, algunos taxones pueden utilizarse como bioindicadores de las condiciones ambientales que afectan a los monumentos (Nimis *et al.* 1987; Ariño y Saiz-Jiménez, 1996b). Parece claro que las condiciones microclimáticas generan presiones selectivas, determinando la distribución de las especies de líquenes, así como el tipo de fotobionte y la estrategia reproductora de los líquenes (Monte, 1993).

Las condiciones ambientales también determinan el morfotipo del líquen, hecho que se interpreta como una estrategia adaptativa. En los lugares con alta insolación y poca humedad, los talos deben estar protegidos ante la desecación y fuerte insolación. Para ello la mejor morfología es la crustácea, ya que es la que ofrece más resistencia a la

pérdida de agua. Además tienen un córtex grueso y a menudo pigmentado, para proteger al fotobionte del exceso de sol, ya que la morfología del talo tiene un papel importante en los procesos relacionados con absorción y pérdida de agua por evaporación (Larson, 1981). La resistencia del talo a la pérdida de agua debida a la evaporación se puede incrementar aumentando el grosor del talo, es decir, su peso específico (la relación entre peso y superficie), y los talos crustáceos son los que tienen un mayor peso específico. Contrariamente, en las zonas con baja luminosidad y alta humedad, predominan los tipos de talos leprarioides. En este caso las condiciones ambientales no hacen necesaria una protección del talo, por lo que el córtex pierde su función y desaparece (incluso sería un estorbo, ya que impediría el paso al fotobionte de la poca luz disponible).

La contaminación atmosférica en áreas industrializadas juega un importante papel reduciendo el número de especies, donde las más resistentes pasan entonces a ser dominantes extendiéndose rápidamente y sustituyendo a las especies que previamente se habían instalado. Asimismo, la nitrificación puede ser un factor determinante en la aparición de algunas comunidades, tal como observaron García-Rowe y Saiz-Jiménez (1991) con la instalación de comunidades ornitocoprófilas en algunas catedrales españolas.

## **Alteración del sustrato por los líquenes**

Existe una amplia bibliografía referida a los procesos de alteración de los sustratos pétreos por la acción de los líquenes, y ha sido durante muchos años, uno de los aspectos que más interés ha suscitado. En general, se pueden considerar dos tipos de efectos de los líquenes sobre un sustrato: procesos físicos o mecánicos (biogeofísicos), que producen la desintegración del sustrato, y procesos químicos (biogeoquímicos), que conducen a la descomposición del sustrato.

El deterioro biogeofísico se considera que viene inducido por cambios de volumen debido al crecimiento de las poblaciones, y especialmente los cambios bruscos que se producen de forma rápida debidos al hinchamiento y contracción según las condiciones de hidratación. La presencia de hifas en el interior de la piedra tienen un efecto directo en la alteración mecánica. Ello se debe a que las hifas están rodeadas de una envuelta mucilagínosa de polisacáridos, con la que se adhieren a las partículas. A través de los movimientos, debidos tanto a su crecimiento como a cambios de hidratación, se crean tensiones capaces de producir alteraciones en la microestructura del material,



principalmente mediante la generación de fracturas y el arranque de partículas.

En el caso del deterioro biogeoquímico, los agentes principalmente implicados son la producción de dióxido de carbono, de sustancias quelantes y de ácido oxálico. Los ascocarpos son las zonas metabólicamente más activas del talo, lo que puede estar relacionado con una mayor producción de metabolitos, entre ellos el ácido oxálico. Ello facilitaría la perforación de la piedra y la instalación de los peritecios y apotecios en cavidades. En los líquenes con talos endolíticos, estos agujeros son la única conexión con el medio externo, necesarios para la dispersión de las esporas. Su tamaño está directamente relacionado con el tamaño de los ascocarpos y llegan a cubrir considerables extensiones de la superficies de los materiales pétreos, originando el denominado "biopitting". Krumbein y Urzi (1991) definieron distintos tipos de *biopitting* según su diámetro, considerando *micropitting* hasta 20  $\mu\text{m}$ , *mesopitting* de 20 a 500  $\mu\text{m}$ , y *macropitting* de 0.5 a 30 mm.

Aunque existe cierta tendencia a atribuir mucha más importancia a los procesos biogeoquímicos, estos junto con los biogeofísicos interactúan e intervienen conjuntamente en el proceso global de biodeterioro.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de aplicar mecanismos para proteger la piedra de la colonización, mediante el uso combinado de materiales hidrófobos (siliconas) asociados a biocidas. Este tratamiento parece dar buen resultado (Gomez-Bolea *et al.* 1999), aunque siempre teniendo en cuenta que algunos factores microclimáticos, como una gran disponibilidad hídrica pueden hacerlo menos efectivo (Ariño *et al.* 2000).

Uno de los problemas presente en los estudios de biodeterioro de los materiales pétreos, es la posible acción beneficiosa de la cubierta de líquenes, representando una capa protectora ante los agentes atmosféricos (Lallemant y Deruelle, 1978). Existen datos en todos los sentidos y sólo el estudio profundo de las interacciones entre el talo del liquen, el microclima y el sustrato en cada caso puede aportar la información necesaria para discernir si el talo protege más que altera o viceversa (Ariño *et al.* 1995).

## **Estudios realizados en la Península Ibérica**

En la Península Ibérica, los estudios sobre los efectos de la colonización por líquenes de los sustratos pétreos, y su relación con el patrimonio cultural, son relativamente recientes, iniciándose en los años 70. Las primeras líneas de investigación se centraron en el efecto de los líquenes sobre sustratos naturales, llevado a cabo básicamente por dos grupos, las publicaciones de los cuales se convierten sin duda, en



referencia obligada para posteriores trabajos (Pomar y Calvet, 1974; Pomar *et al.* 1975; Ascaso, 1976; Ascaso y Galvan, 1976; Ascaso *et al.* 1976; Pomar, 1979).

Casi de forma consecutiva, aparecieron los primeros trabajos en los que se aplican dichos conocimientos al estudio de biodeterioro de monumentos, iniciando así una nueva línea de investigación en el sur de la Península Ibérica (Saiz-Jiménez, 1981, 1984, 1989), y posteriormente en Portugal (Aires-Barros *et al.* 1989, 1991, 1992). En esta fase temprana, una de las prioridades era conocer la flora líquénica más común en este tipo de sustratos y ambientes. Los resultados proporcionaron extensa información sobre la flora de sustratos carbonatados de monumentos en el sur de la Península (García-Rowe y Saiz-Jiménez, 1988, 1989, 1991, 1992; Saiz-Jiménez *et al.* 1991; Saiz-Jiménez y García-Rowe, 1992).

En los años noventa se produce un fuerte incremento en la dedicación al estudio de los líquenes y el biodeterioro, posiblemente como consecuencia de la política del Gobierno Español así como de los programas de investigación de la Comunidad Económica Europea. Se distinguen tres grupos principales, con líneas diferentes. Un grupo en Madrid que sigue centrado en el estudio de la interfase líquen/sustrato, aplicando nuevas tecnologías de análisis y microscopía (Ascaso *et al.* 1993, 1997, 1998; Ascaso y Wierzychos, 1994a, 1994b, 1995; Wierzychos y Ascaso, 1994, 1996). En Sevilla, y como continuidad de la línea emprendida años atrás, se estudia la distribución, ecología y efectos de los líquenes sobre sustratos carbonatados en las zonas arqueológicas de Andalucía (Puertas *et al.* 1994; Saiz-Jiménez y Ariño, 1995; Ariño *et al.* 1995, 1997; Ariño y Saiz-Jiménez, 1996a, 1996b, 1996c, 1997; Nimis *et al.* 1998). En Santiago de Compostela se consolida un nuevo grupo dedicado al estudio de los líquenes sobre sustratos graníticos de los monumentos del noroeste de la Península, con un interesante enfoque multidisciplinar (Prieto *et al.* 1994, 1995a, 1995b, 1999; Silva *et al.* 1997).

En los próximos años, además de consolidar las líneas de investigación en este campo y de consolidar los conocimientos de los últimos veinticinco años, sería interesante profundizar en el estudio de los mecanismos que facilitan la colonización de los sustratos así como de algunos aspectos de la biología de los líquenes, especialmente la fijación y germinación de las diásporas, para así poder disponer de una base científica sólida sobre la que proponer medidas de conservación y tratamiento de los materiales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian, V. (1993) *The Lichen Symbiosis*. John Wiley, New York
- Aires-Barros L., Alves L., Esteves, L. (1991) New data on saxicolous lichenic vegetation in monuments as bioindicator of pollution. En: D. Decrouez, J.I. Chamay and F. Zezza (eds.) 2nd Intern. Symp. on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, 115-120.
- Aires-Barros, L., Basto, J., Graça, R.C., Alves, L.M., Esteves, L. (1992) The decay of limestone caused by saxicolous lichens: the case of the monastery of Jeronimos (Lisbon, Portugal). En: J. Delgado Rodrigues, F. Henriques, F. Telmo Jeremias (eds.), *Proc. Intern. Cong. on Deterioration and Conservation of Stone*. Lisbon, Portugal, 335-344.
- Aires-Barros, L., Basto, J., Graça, R.C., Alves, L.M., Esteves, L., Carmo, A., Ribeiro, L. (1989) The decay of limestone caused by saxicolous lichens: the case of the Monastery of Jeronimos (Lisbon, Portugal). En: F. Zezza (ed.): *Proc. 1st Intern. Symp. on the Conservation of the Monuments in the Mediterranean Basin*. Barim, 225-229.
- Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Gómez-Bolea, A., Saiz-Jiménez, C. (1995) Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cadiz, Spain): biodeterioration vs bioprotection. *The Science of the Total Environment* **167**, 353-364.
- Ariño, X., Saiz-Jiménez, C. (1996a) Biological diversity and cultural heritage. *Aerobiologia* **12**, 272-279.
- Ariño, X., Saiz Jiménez, C. (1996b) Colonization and weathering processes in roman stuccos by cyanobacteria, algae and lichens. *Aerobiologia* **12**, 9-18.
- Ariño, X., Saiz-Jiménez, C. (1996c) Lichen Deterioration of consolidants used in the conservation of stone monuments. *Lichenologist* **28**, 391-394.
- Ariño, X., Gómez-Bolea, A., Saiz-Jiménez, C. (1997) Lichens on ancient mortars. *International Biodeterioration and Biodegradation* **40**, 217-224.
- Ariño, X., Saiz-Jiménez, C. (1997) Deterioration of the Elephant Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation* **40**, 233-239.
- Ariño, X., Canals, A., Gómez-Bolea, A., Saiz-Jiménez, C. (2000) Re-Colonization of the Temple of Mudéjar, Guadalupe Monastery, Cáceres, Spain, after silicone/biocide treatment. In: 5th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Seville 2000., pp. 69-71.
- Armstrong, R.A. (1988) Substrate colonization, growth, and competition. In *Handbook of Lichenology*, Vol. 2, M. Galun (ed.), Boca Raton: CRC Press, 3-16.
- Ascaso, C., Galvan, J. (1976) Studies on the pedogenetic action of lichen acids. *Pedobiologia* **16**, 321-331.



- Ascaso, C., Wierzechos J. (1994a) Structural aspects of the lichen-rock interface using back-scattered electron imaging. *Botanica Acta* **4**, 187-270.
- Ascaso, C., Wierzechos, J. (1994b) Nuevas aplicaciones de las técnicas submicroscópicas en el estudio del biodeterioro producido por talos líquénicos. *Microbiología SEM* **10**, 103-110.
- Ascaso, C., Wierzechos, J. (1995) Study of the biodeterioration zone between the lichen thallus and the substrate. *Cryptogamic Botany* **5**, 270-281.
- Ascaso, C. (1976) Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
- Ascaso, C., Galvan, J., Ortega, C. (1976) The pedogenic action of *Parmelia conspersa*, *Rhizocarpon geographicum* and *Umbilicaria pustulata*. *Lichenologist* **8**, 151-171.
- Ascaso, C., Vizcaino, C., García González, M.T. (1993) Biodeterioration produced by *Lecanora albescens* (Hoffm.) Branth & Rostr. on the abaci of the Silos Monastery. En: Alteraciones de Granitos y Rocas Afines. CSIC. 181-186.
- Bailey, R.H. (1976) Ecological Aspects of Dispersal and Establishment in Lichens. En: Brown et al. (Eds.) *Lichenology: Progress and Problems*, Academic Press, 215-247.
- Bouly de Lesdain, M. (1905) Lichens des environs de Versailles. *Bull. Soc. Bot. de Fr.* **52**, 602-628.
- Bouly de Lesdain, M. (1921) Lichens des environs de Versailles. *Bull. Soc. Bot. de Fr.* **68**, 16-24.
- Deruelle, S. (1988) Effects de la pollution atmosphérique sur la végétation lichénique des monuments historiques. *Studia Geobotanica* **8**, 23-31.
- García-Rowe, J., Saiz-Jiménez, C. (1988) Colonization of mosaics by lichens: The case study of Itálica. *Studia Geobotanica* **8**, 65-71.
- García-Rowe, J., Saiz-Jiménez, C. (1989) Colonización y alteración de mosaicos por líquenes y briófitos. I Coloquio Nacional de Conservación de Mosaicos 59-73.
- García-Rowe, J., Saiz-Jiménez, C. (1991) Lichens and bryophytes as agents of deterioration of building materials in Spanish cathedrals. *International Biodeterioration* **28**, 151-163.
- García-Rowe, J., Saiz-Jiménez, C. (1992) A case study of the corrosion of stone by lichens: The mosaics of the Roman Remains of Itálica. En: C.A.C Sequeira y A.K. Tiller (eds.): *Microbial Corrosion. Proceed. of the 2nd EFC Workshop*, 275-281.
- Gómez-Bolea, A., Ariño, X., Balzarotti, R., Saiz-Jiménez, C. (1999) Surface treatment of stones: Consequences on lichen colonisation. En: *Of microbes and Art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, Florence, 233-237.
- Guillitte O. (1995) Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sc. Tot. Environ.* **167**, 215-220.



- Hawksworth, D.L. (1988) Conidiomata, conidiogenesis, and conidia, In Handbook of Lichenology, Vol. I. M. Galun (ed.), Boca Raton, CRC Press, 181-193.
- Honegger, R. (1996) Mycobionts in Lichen Biology. Edited by T.H. Nash III. Cambridge University Press.
- Krumbein, W.E., Urzi, C. (1991) Biologically induced decay phenomena of antique marbles - some general considerations. En: D. Decrouez, J. Chamay y F. Zezza (eds.), 2nd Intern. Symp. on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. Geneve, 219-235.
- Lallemant, R., Deruelle, S. (1978) Presence des lichens sur les monuments en pierre. Nuisance ou protection? Int. Symp. on Deter. and Protec. of stone monuments, Paris.
- Larson D.W. (1981) Differential Wetting in some lichens and mosses: the role of morphology. *The Bryologist* **84**, 1-15.
- Mattiolo, O. (1928) I licheni e la malattia delle vetrare antiche. Rivista Archeologica della Provincia e antica diocesi di Como **94-95**, 3-23.
- Monte, M. (1993) The influence of environmental conditions on the reproduction and distribution of epilithic lichens. *Aerobiologia* **9**, 169-179.
- Nimis, P.L., Monte, M., Tretiach, M. (1987) Flora e vegetazione lichenica di aree archeologiche del Lazio. *Studia Geobotanica* **7**, 3-161.
- Nimis, P.L., Pinna, D., Salvadori, O. (1992) Licheni e conservazione dei monumenti. Bologna: CLUEB.
- Nimis, P.L., Seaward, M.R.D., Ariño, X., Barreno, E. (1998) Lichen-induced chromatic changes on monuments: a case study on the roman amphitheater of Italica (S Spain). *Plant Biosystems* **132**, 53-61.
- Poelt, J., Mayrhofer, H. (1988) Über Cyanotrophie bei Flechten. *Plant Systematics and Evolution* **158**, 265-281.
- Pomar, L., Calvet, F. (1974) Nota previa sobre el análisis comparativo de elementos traza en las aguas de escorrentía superficial como indicadores de la acción alterante de microorganismos. *Bolet. Soc. Hist. Nat. Baleares* **XIX**, 115-138.
- Pomar, L. (1979) Procesos telodiagenéticos en rocas carbonatadas del litoral catalán y balear: su relación con microorganismos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona 0:1-20.
- Pomar, L., Esteban, M., Llimona, X., Fontarnau, R. (1975) Acción de líquenes, algas y hongos en la telodiagénesis de las rocas carbonatadas de la zona litoral-prelitoral catalana. *Inst. Invest. Geolog. Univ. Barcelona* **30**, 83-117.
- Prieto, B. (1996) Biodeterioro de rocas graníticas. Contribución de los líquenes al deterioro del Patrimonio Monumental construido. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.

- Prieto, B., Rivas, T., Silva, B., Carballal, R., López de Silanes, M.E. (1994) Colonization by lichens of granite dolmens in Galicia (NW Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation* **34**, 47-60.
- Prieto B., Silva B., Rivas T., Carballal R., Sanchez-Biezma, M.J. (1995a) Etude ecologique de la colonisation lichenique des eglises des environs de Saint Jacques de Compostela. *Cryptogamie, Bryol. Lichenol.* **16**, 219-228
- Prieto B., Rivas, M.T., Silva, B. (1995b) Colonization by lichens of granite churches in Galicia (NW Spain). *Science of the Total Environment* **167**, 343-351
- Prieto, B., Silva, B., Rivas, T., Wierzechos J., Ascaso C. (1997) Mineralogical transformation and neoformation in granite caused by lichens *Tephromela atra* and *Ochrolechia parella*. *Intern. Biodeter.* **40**, 191-199
- Puertas, F., Blanco-Varela, M.T., Palomo, A., Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jiménez, C. (1994) Characterization of mortars from the mosaics of Italica: causes of deterioration. En: V. Fassina, H. Ott and F. Zezza (eds.): III Intern. Symp. on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Venezia, 577-583.
- Puertas, F., Blanco-Varela, M.T., Palomo, A., Ortega-Calvo, J.J., Ariño, X., Saiz-Jiménez, C. (1994) Decay of roman and repair mortars in mosaics from Italica, Spain. *The Science of the Total Environment* **153**, 123-131.
- Roux, C. (1981) Etude ecologique et phytosociologique des peuplements lichéniques saxicoles-calcicoles de SE de la France. *Bibl. Lichenol.* **15**
- Saiz-Jiménez, C., García-Rowe, J. (1992) Biodeterioration of marbles and limestones in Roman pavements. En: V. Fassina (ed.): 2nd Inter. Symp. for the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. Geneve, 247-255.
- Saiz-Jiménez, C. (1981) Weathering of building materials of the Giralda (Seville Spain) by lichens. ICOM Committee for Conservation 6th Triennial Meeting. Ottawa, 1-9.
- Saiz-Jiménez, C. (1984) Weathering and Colonization of Limestones in an Urban Environment. En: J. Szegi (ed.): Soil Biology and Conservation of the Biosphere. Akademiai Kiado, Budapest. 2, 757-767.
- Saiz-Jiménez, C. (1989) Biogenic vs anthropogenic oxalic acid in the environment. En: Atti Convegno Le pellicole ad ossalato: origine e significato nella osservazione delle opere d'arte. Milano. Centro C.N.R. Gino Bozza, 171-182.
- Saiz-Jiménez, C. (1994) Biodeterioration of Stone in Historic Building and Monuments. En: G.C. Llewellyn, W.V. Dashek y C.E. O'Rear (eds.) Biodeterioration Research 4. Plenum Press. New York and London, 587-604.
- Saiz-Jiménez, C., García-Rowe, J., Rodríguez-Hidalgo, J.M. (1991) Biodeterioration of polychrome roman mosaics. *International Biodeterioration* **28**, 65-79.

- Sáiz-Jiménez C. y Ariño X. (1995) Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos. *Materiales de Construcción* **45**, 5-16.
- Schuster, G., Ott, S., Jahns, H.M. (1985) Artificial cultures of lichens in the natural environment. *Lichenologist* **17**, 247-253.
- Silva, B., Prieto, B., Rivas, T., Sanchez-Biezma, M.J., Paz, G., Carballal, R. (1997) Rapid biological colonization of a granitic building by lichens. *Intern. Biodeter.* **40**, 263-267
- Wierzechos, J., Ascaso, C. (1994) Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface. *Journal of Microscopy* **175**, 54-59.



# **MONITORIZACIÓN EN CONTINUO DE PARÁMETROS MICROAMBIENTALES EN SISTEMAS KÁRSTICOS SOMEROS. APLICACIÓN A LA CONSERVACIÓN DEL ARTE PREHISTÓRICO (CUEVA DE ALTAMIRA, ESPAÑA)**

**S. Sánchez-Moral<sup>1</sup>; V. Soler<sup>2</sup>; J. Bedoya<sup>1</sup> y J.C. Cañaveras<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC),*

*José Gutiérrez Abascal, 2. E-28006 Madrid, España.*

<sup>2</sup>*Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de Canarias,*

*Astrofísico Francisco Sánchez 3, Apdo. Correos 195,*

*E-38206 La Laguna, Tenerife, España.*

<sup>3</sup>*Dept. Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente, Universidad de Alicante,*  
*Apdo. Correos 99, E-03080, Alicante, España.*

## **RESUMEN**

Los estudios de conservación del patrimonio prehistórico en cuevas kársticas deben sustentarse en un conocimiento multidisciplinario (geología, clima, hidroquímica, microbiología) lo mas completo posible. El empleo de sistemas de adquisición automatizada de datos microambientales en sistemas kársticos permite un seguimiento en continuo, detallado y de alta precisión de sus parámetros microclimáticos principales (temperatura del aire y de la roca, concentración en CO<sub>2</sub>, humedad relativa y total, concentración en radon, etc). La conjunción de los datos microclimáticos, hidroquímicos y microbiológicos conducen al establecimiento modelos fisico-químicos y a un acercamiento al equilibrio agua-aire-roca en sistemas kársticos con arte rupestre, como en el caso de la Cueva de Altamira (Cantabria, España), que permiten caracterizar y valorar los procesos de degradación y biodeterioro que las afectan.

## **INTRODUCCIÓN**

El arte rupestre en cuevas ha contribuido a un mejor y mayor conocimiento de los ancestros del hombre. La mayor parte de las cuevas con arte rupestre ha sufrido modificaciones de origen antrópico e intensos regímenes de visitas que han contribuido al deterioro de las mismas. Uno de los problemas mas importantes en este tipo de cuevas, y en concreto en la preservación del patrimonio cultural (geológico, biológico e histórico) en ellas es la colonización biológica. Con objeto de favorecer la preservación de las representaciones artísticas en cuevas turísticas y hacer su disponibilidad al público compatible con su adecuada conservación es necesario la elaboración de medidas de gestión y protección de estos bienes culturales. La protección y gestión

del patrimonio prehistórico en cuevas kársticas debe sustentarse en un estudio científico multidisciplinario (geología, clima, hidroquímica, microbiología) lo más completo posible. En la segunda mitad de la década de los cincuenta se inician de forma sistemática los estudios microclimáticos en cavidades kársticas, aunque no fue hasta la década de los setenta cuando los conocimientos adquiridos sobre la distribución y evolución de parámetros microambientales en sistemas kársticos se aplicaron a cuevas turísticas (por ej.: Andrieux, 1974, Wilkening y Watkins, 1976). En los años ochenta y noventa, son ya más numerosos los trabajos que se han ocupado de una forma u otra de la influencia de las transformaciones antrópicas en el medio kárstico y de los visitantes en las condiciones microambientales de las cavidades kársticas (ej.: Villar *et al.*, 1984; Ek y Gewalt, 1985; Fernández *et al.*, 1986; Cigna, 1993; Hoyos *et al.*, 1998; Cañaveras *et al.*, 1999; Sánchez-Moral *et al.*, 1999). La principal conclusión que se obtiene de este grupo de trabajos y de los anteriores, indica que la resolución de problemas de conservación de cuevas con arte rupestre está directamente relacionada con un completo conocimiento del equilibrio físico-químico del sistema kárstico. Los estudios hidroquímicos y microclimáticos, incluyendo estos últimos el diseño e instalación de sistemas de medidas automatizados, conducen al conocimiento de los intercambios de energía y masa entre las superficies rocosas, la atmósfera de la cueva y las aguas kársticas, cuyo complejo equilibrio es el que rige todos los procesos kársticos. Los estudios microambientales (climáticos e hidroquímicos) junto con los microbiológicos permiten discriminar entre las modificaciones naturales y las antrópicas dentro del ambiente kárstico.

## METODOLOGÍA

### Características geológicas del sistema kárstico

La investigación geológica del sistema kárstico sometido (ej: Cueva de Altamira) a investigación incluye el estudio de la composición mineralógica y geoquímica del encajante y los espeleotemas, la caracterización estructural y geomorfológica del sistema de cuevas y la caracterización hidrológica del mismo, con objeto de determinar las principales vías y modos de circulación de agua, así como definir la correcta disposición de los sistemas de monitorización.

La Cueva de Altamira se encuentra en la zona superior de un pequeño cerro calcáreo (158 m.s.n.m.) correspondiente a calcarenitas parcialmente dolomitizadas de edad Albiense. Esta cueva pertenece a la zona vadosa de un sistema kárstico tabular, poligénico y senil de



edad Pliocena, cuyas cavidades superiores (Altamira) se encuentran muy próximas a la superficie, siendo su alimentación hídrica por infiltración directa de agua de lluvia a través de fracturas y fisuras.

Esta cueva es famosa por poseer una valiosa colección de pinturas y grabados paleolíticos, en especial los situados en el techo de la Sala de Polícromos, los cuales han sido calificados como la Capilla Sixtina del arte cuaternario. Esta pequeña sala tiene un volumen de unos  $326\text{m}^3$ , con una superficie interna de  $150\text{m}^2$  y una altura media de 2,4 m (Figura 1).



**Figura 1:** Localización de los elementos constituyentes del sistema de adquisición de datos microambientales en la Cueva de Altamira.



Las óptimas y excepcionales condiciones de preservación de las pinturas de la Sala de Polícromos, inmediatamente después de su descubrimiento, se debieron principalmente a la confluencia de dos condicionantes muy favorables. Por un lado, la baja tasa de infiltración de agua a través de los estratos calcáreos que separan la Sala de los Polícromos y la superficie exterior, y por otro, al mantenimiento de unas condiciones microclimáticas estables desde el cierre natural de la cueva hasta su descubrimiento.

## **Encuadre en estudios multidisciplinarios**

Desde el descubrimiento a finales del siglo XIX, la cueva de Altamira se ha visto sometida a un alto régimen de visitas. La masiva afluencia de visitantes, que superaban frecuentemente la cifra de 100.000 por año, especialmente durante los años 50, 60 y principios de los setenta provocaron la alteración de las condiciones microambientales naturales y con ello un alto deterioro de las pinturas paleolíticas, lo que llevó a su cierre en 1977. Tras una serie de estudios microclimáticos a principios de los años 80 (Villar *et al.*, 1984; Fernández *et al.*, 1986), la cueva fue nuevamente abierta al público en 1982 con un régimen de visitas restringido (9440 por año) y unas medidas de control que actualmente siguen en vigor. Los estudios y observaciones posteriores (Hoyos, 1993; Cañaveras *et al.*, 1999; Sánchez-Moral *et al.*, 1999) han puesto de manifiesto la necesidad de revisar los criterios empleados para la definición del régimen de visitas actual ya que los procesos de deterioro seguían en progreso.

Mediante el diseño e instalación de un sistema de medidas de parámetros microambientales, innovador, de amplio espectro y alta resolución (Soler *et al.*, 1999) se ha podido llevar a cabo un estudio integrado de la cueva de carácter multidisciplinar (microclimático, geológico, geoquímico, y microbiológico) en el que uno de los principales objetivos era la caracterización de las condiciones microclimáticas de la cueva a lo largo de dos ciclos anuales completos. A partir de los datos obtenidos se puede llegar al establecimiento de un modelo de estudio y evaluación del grado de alteración y de la influencia antrópica en los procesos de deterioro, así como la cuantificación del balance de masas del intercambio de CO<sub>2</sub> entre dichos sistemas y la atmósfera.

## **Diseño del sistema de medidas de parámetros microclimáticos**

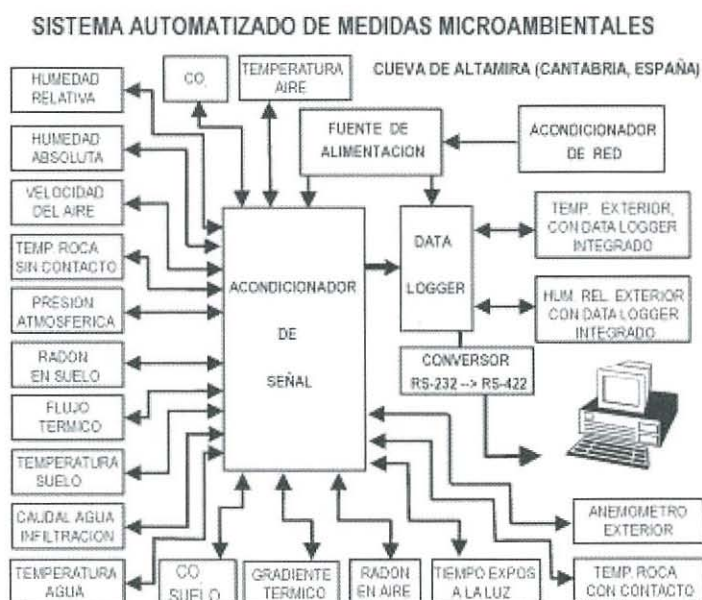
Debido a las especiales condiciones microambientales de las cavidades kársticas, el equipo de medidas diseñado cumple los siguientes requisitos fundamentales:

- Soportar condiciones de trabajo en H.R. 100% permanentemente.
- Modo de funcionamiento en continuo e inatendido a prueba de fallos en alimentación eléctrica.
- Bajo mantenimiento.
- Sensibilidad suficiente para detectar pequeños cambios en los diferentes parámetros monitorizados.

En el diseño específico del sistema de medidas de parámetros microambientales en la Cueva de Altamira también se han contemplado una serie de caracteres específicos de la cueva, como son las dimensiones de las diferentes cavidades y pasajes y las tasas de ventilación natural. Asimismo, ha sido necesario unos estudios microclimáticos puntuales y previos a la instalación definitiva del sistema de medidas, enfocados a una correcta selección, disposición y diseño de los elementos que conforman el mismo (por ejemplo, para ajustar el rango de medidas de los sensores).

## El sistema de medidas

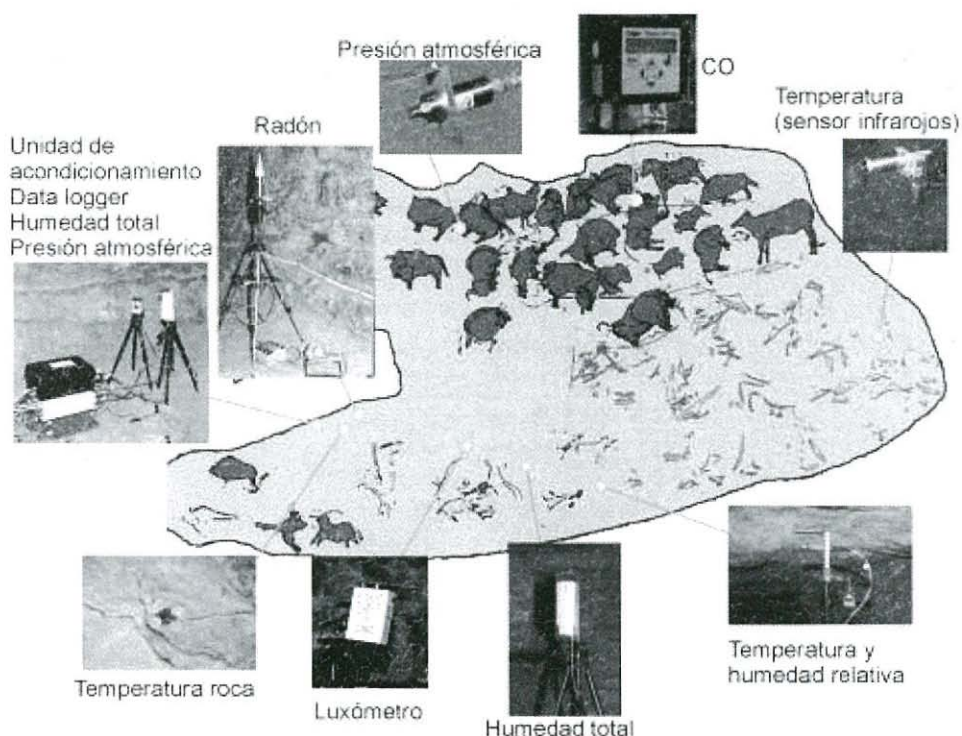
En la Figura 2 se presenta un organigrama con todos los elementos que componen el sistema. El equipo se desarrolla en torno a un DATALOGGER autónomo con resolución de 15 bit más signo.



**Figura 2:** Diagrama esquemático de los elementos que componen el sistema de adquisición de datos microambientales en la Cueva de Altamira.



La ubicación del DATALOGGER en el interior de la cueva permite por una parte mantener condiciones isotermas de trabajo y por otra utilizar cables de conexión de longitud moderada y para evitar los efectos de caída de señal producida por el propio cable, hemos trabajado en casi todos los casos en modo de lazo de corriente. La disposición de los distintos elementos tanto en el interior como en el exterior de la Cueva de Altamira se presenta en la Figura 1, asimismo, en la figura 3 se detalla la distribución de sensores dentro de la Sala de Polícromos. Todos los elementos sensores son comerciales, excepto el sensor de  $R_n$  del interior de la cueva que ha sido específicamente diseñado y construido para este caso. El equipo se completa con una interface de comunicaciones RS232 que enlaza con un PC a través del cual se realiza la recuperación de datos; todo ello permite realizar dicha recuperación así como controles de funcionamiento a distancia vía modem.



**Figura 3:** Distribución de los sensores en la Sala de Polícromos (Cueva de Altamira)



Para moderar el coste global del sistema, alcanzando la resolución necesaria en la medida de las pequeñas variaciones de temperatura que se producen en el interior de la cueva, se ha realizado el acondicionamiento de señal pertinente. Mediante este sencillo sistema acortamos notablemente el rango de medida de los sensores y se mejora la sensibilidad correspondiente a los 15 bit de resolución del equipo utilizado. Para otros parámetros como el CO<sub>2</sub> que presentan amplios rangos de variación únicamente se ha utilizado una transformación de tensión a voltaje. El sistema consta de una referencia de voltaje independiente y de alta estabilidad para comprobar la posible deriva electrónica del sistema.

Se realizó una calibración del sistema, previamente a su puesta en marcha definitiva, para lo cual, todos los elementos sensores de cada tipo, una vez conectados a la unidad central por medio de los cables con su longitud definitiva, se situaron agrupados durante dos días en el interior de la cueva, obteniéndose medidas homogéneas.

Con el fin de aprovechar al máximo la capacidad de memoria de DATALOGGER, reduciendo al máximo el tiempo de atención periódica al equipo se ha adoptado la siguiente estrategia de intervalos de medida: (i) Para aquellos parámetros dominados fundamentalmente por la dinámica natural del sistema kárstico, se ha programado el equipo para la realización de una medida cada hora. (ii) Para caracterizar el efecto producido por el ciclo diario de visitas, los elementos sensores de temperatura (aire-roca), CO<sub>2</sub>, y Humedad total situados en la Sala de los Polícromos, realizan una medida cada minuto. En todos los casos cada medida representa el promedio de 10 conversiones A/D consecutivas.

Para llevar a cabo la caracterización del microclima de la cavidad se han utilizado los siguientes sensores (Figura 3):

### ***Campo de Temperaturas***

- Atmósfera interior cueva: Tres sensores comerciales basados en elementos Pt-100)
- Aire exterior de la cueva: Un datalogger autónomo ubicado en una estación meteorológica del Instituto Nacional de Meteorología, con la que posteriormente se contrastan los datos.
- Roca exterior: Un termopar de tipo K.
- Suelo exterior: Un termopar de tipo K.
- Medida sin contacto de la temperatura del techo de la cueva en una zona con pinturas (sala Polícromos): Un termopar de radiación infrarroja trabajando en la longitud de onda 8-14µm.

**Concentraciones de CO<sub>2</sub>.** Tres sensores comerciales basados en espectrómetros de absorción de infrarrojos de doble haz, situados en 2 puntos del interior de la cueva y 1 en el exterior.

**Presión Atmosférica:** Un transductor electrónico de membrana de acero inoxidable.

### ***Variación en la concentración de Radón***

- Suelo exterior: Un sensor para medida de <sup>222</sup>Rn en suelos que utiliza como elemento detector un semiconductor de silicio.
- Atmósfera interior: Un sensor para medida de <sup>222</sup>Rn en aire específicamente diseñado y basado en escintilometría de la radiación ALPHA procedente de la desintegración del <sup>222</sup>Rn.

**Flujo Térmico.** Un sensor de tipo “termopila” ubicado en el techo de la Sala de los Polícromos para detectar los intercambios de calor entre la cueva y el exterior, a través del techo de dicha sala.

**Flujos de Aire:** Dos termoanemómetros de hilo calefactor.

**Agua total en el aire de la cueva.** Un sensor instalado en la Sala de Polícromos basado en espectrometría de absorción de infrarrojos.

### ***Tasa de Infiltración de Agua:***

- Un medidor de lluvia instalado en el interior de la cueva y basado en vaciado de cucharilla calibrada.
- Pluviómetro exterior.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

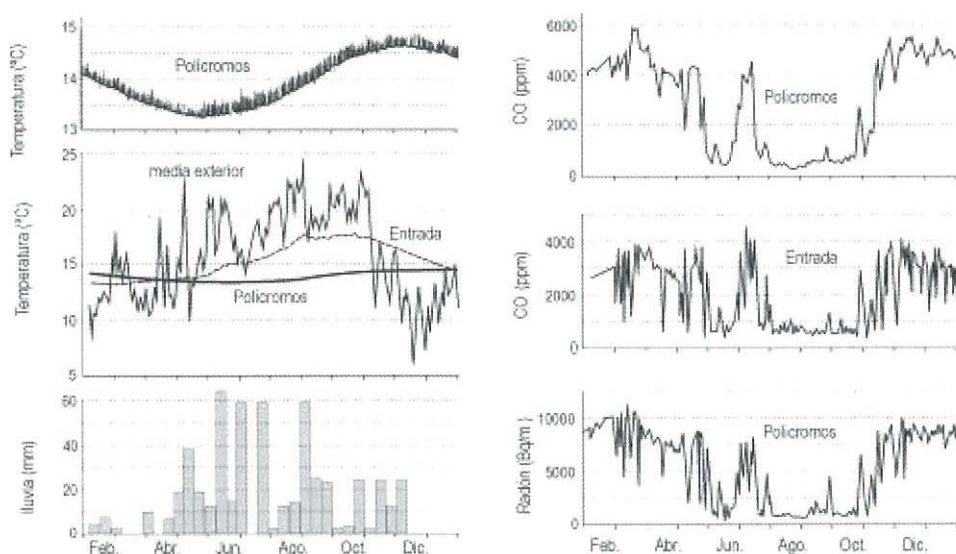
### **Caracterización microclimática de la Cueva de Altamira durante un ciclo anual completo.**

Los resultados obtenidos sobre las variaciones de los principales parámetros microambientales en la cueva durante el ciclo anual estudiado son los siguientes.

### **Temperaturas**

En la Figura 4 se muestra la evolución de las temperaturas en un ciclo anual completo (febrero 1997-febrero 1998). En la Sala de

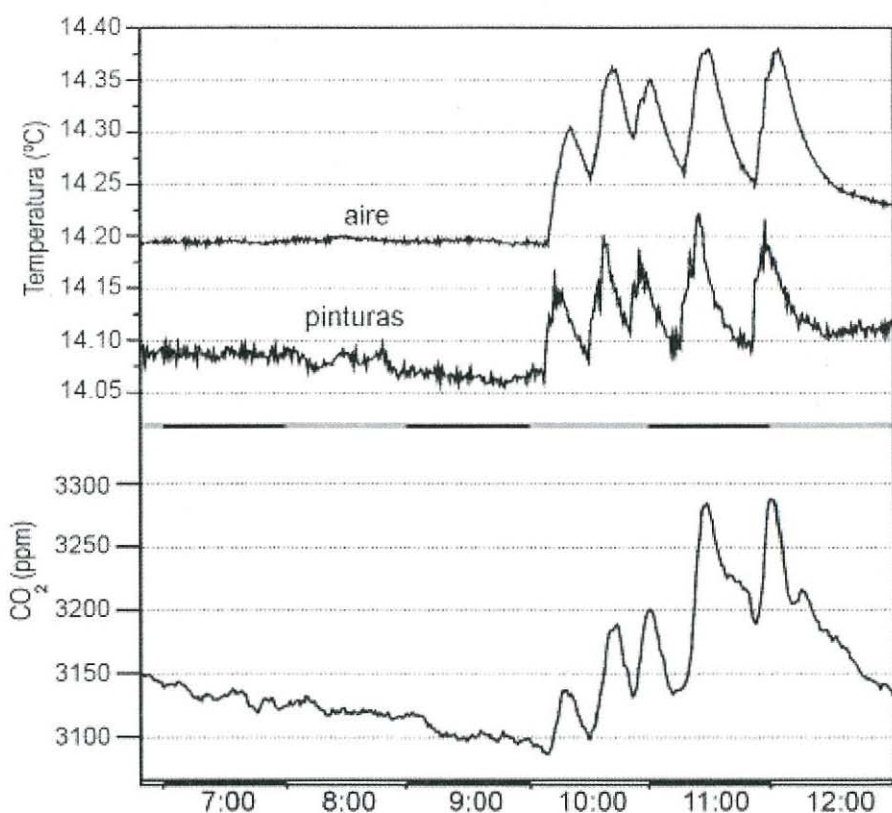
Polícromos (zona interna de la cueva) la temperatura del aire presenta un bajo rango de variación estacional y diario, oscilando entre 13.25°C y 14.85°C. Esta variación es parcialmente debida a la influencia de los visitantes, los cuales producen incrementos medios diarios de 0.25°C. Asimismo, en la evolución anual de las temperaturas en esta zona interna de la cueva se observa un fenómeno de inversión térmica, por el cual la menor temperatura se alcanza al principio del verano y los valores más altos se alcanzan a finales del otoño; este efecto ya ha sido detectado en otras cuevas del norte de la Península Ibérica (Hoyos et al., 1998). Pueden observarse dos períodos de relativa estabilidad (junio y diciembre) que separan dos períodos bien diferenciados (Figura 4): enero-mayo durante el cual la temperatura decrece, y julio-octubre en el que se produce un incremento también progresivo. Debido a la influencia de la atmósfera exterior, la temperatura del aire en la zona de la entrada de la cueva presenta un amplio rango de oscilación a corto y largo período, entre 13.15°C en invierno y 17.85°C en verano. A partir de la mitad del mes de mayo y hasta la primera decena de noviembre, la temperatura del aire exterior se mantiene constantemente por encima de la del interior de la cueva (Sala de Polícromos). La diferencia de temperaturas entre el interior y el exterior de la cueva es uno de los factores determinantes en los fenómenos de intercambio de gases entre el sistema kárstico y el exterior.



**Figura 4:** Ciclo anual de las variaciones de los principales parámetros microambientales (Febrero 1997-Febrero 1998).



La Figura 5 muestra los resultados del primer día de medidas de la temperatura de las pinturas mediante radiación infrarroja y de la temperatura ambiente de la sala de los policromos, donde se denota de forma neta la incidencia de los cinco grupos de visitas sobre la temperatura de las pinturas. El desfase entre ambos registros obedece principalmente a la rápida respuesta de los sensores infrarrojos, que es del orden de milisegundos, frente a la mayor inercia térmica de los elementos Pt-100 y su protección, utilizados en los sensores de temperatura ambiente. La diferencia observada de unos  $0.11^{\circ}\text{C}$  inferior en las pinturas, se mantiene durante todo el año hecho que favorece los fenómenos de condensación y por tanto los procesos de corrosión. Este aspecto se ha podido constatar asimismo por el flujo térmico permanentemente positivo en el sentido aire-techo medido durante todo un ciclo anual. El ruido de fondo de toda la cadena de elementos electrónicos para la medida de la temperatura ambiente, sin tratamiento estadístico para su reducción, es del orden de unos  $0.015^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5:** Influencia de cinco grupos de visitantes consecutivos, en la temperatura del aire, temperatura de la roca/pinturas y  $\text{CO}_2$  del aire en la Sala de Policromos.

## ***CO<sub>2</sub> del aire de la cueva***

La concentración de CO<sub>2</sub> en aire de la cueva a lo largo del ciclo anual estudiado oscila entre 300 y 6000 ppmv. Este parámetro muestra en general una curva de variación paralela entre la zona externa (entrada) e interna (Policromos), si bien en la primera presenta un menor rango de variación anual pero mayor oscilación en ciclos de corto período. Los valores máximos se alcanzan durante el período Noviembre-Mayo y los mínimos durante el verano, coincidiendo estos últimos con la fase en la que la temperatura exterior se mantiene constantemente por encima de la temperatura del aire en el interior y la presión atmosférica se mantiene relativamente estable en valores próximos a 1005 mb. La concentración anual media es de 3025 ppmv, incluyendo los incrementos medios diarios de 500 ppmv producidos por la entrada de los visitantes (Figura 4).

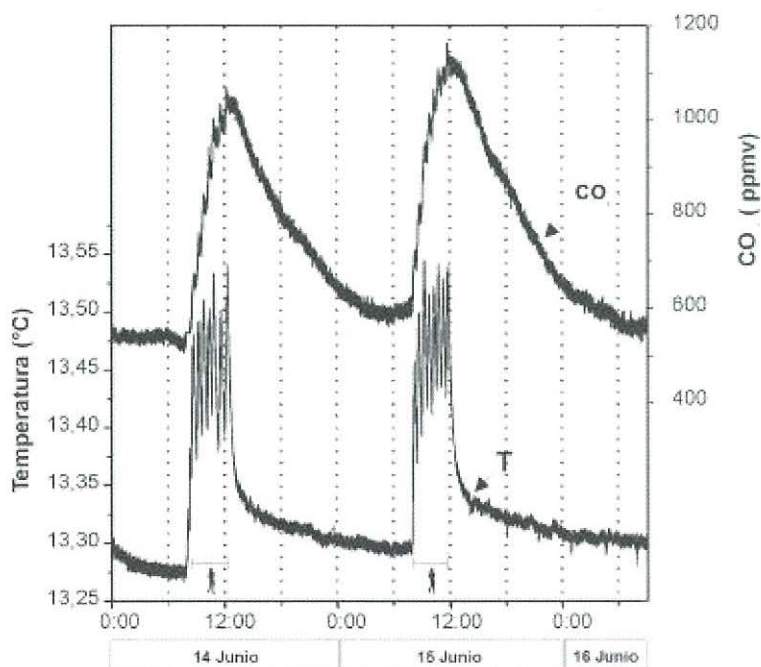
## ***Concentración de Radón***

La evolución de las concentraciones de <sup>222</sup>Rn en aire muestra un significativo paralelismo con las curvas de concentración en CO<sub>2</sub> en el interior de la cueva. La concentración anual oscila entre 300 y 11250 Bq/m<sup>3</sup>. Las concentraciones mínimas de <sup>222</sup>Rn se registran durante los meses de verano. Es en este periodo cuando se produce una mayor tasa de intercambio de gases entre el sistema y kárstico y el exterior.

## ***Humedad relativa del aire interior***

La humedad relativa del aire en el interior de la cueva permanece muy próxima a la saturación a lo largo de todo el año, oscilando entre el 97 y el 100%, suficiente para mantener un continuo grado de humedad sobre las pinturas. En el exterior de la cueva oscila entre el 60 y el 100% alcanzando los máximos valores en los periodos de otoño e invierno y manteniéndose durante gran parte del año en valores superiores al 90%.

La influencia de la presencia de visitantes en la cueva también queda registrado por el sistema de medidas automatizado. Debido a su propio metabolismo de los visitantes (emisión de calor, CO<sub>2</sub> y vapor de agua, consumo de oxígenos), se produce una serie de variaciones en el microclima de la cueva. En la Figura 6 se presenta un ejemplo de cómo los visitantes influyen en la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> del aire en la sala de policromos. Durante el período reflejado por la gráfica el régimen de visitas es de ocho grupos (cinco visitantes mas el guía) consecutivos diarios. En el período de Diciembre a Mayo, las visitas



**Figura 6:** Variaciones en la temperatura y concentración de CO<sub>2</sub> en el aire de la Sala de Polícromos durante dos días con visitantes (Junio, 1997).

producen un incremento medio diario de 450 ppmv en la concentración de CO<sub>2</sub> y de 0,22°C en la temperatura del aire. En el periodo de Mayo a finales de Octubre, periodo en el que el numero de visitantes es ligeramente mayor, estos valores medios son de 525 ppmv y 0,25°C para la concentración de CO<sub>2</sub> y la temperatura, respectivamente. Una vez que las visitas abandonan la cueva, la temperatura recupera aproximadamente sus valores normales previos en unos 70 minutos. Por el contrario la concentración de CO<sub>2</sub> desciende hasta valores cercanos a los iniciales después de 18 horas desde la salida de las visitas, hecho que favorece el desarrollo de los procesos de corrosión del soporte.

### Modelización de procesos de corrosión y biodeterioro

La conjunción de los datos microclimáticos con los hidroquímicos han permitido establecer modelos fisico-químicos que han permitido un acercamiento al complejo equilibrio agua-aire-roca en el sistema kárstico. En este sentido se ha modelizado la influencia de de los visitantes en los procesos de microcorrosión en las paredes de la cueva (Sánchez-Moral *et al.*, 1999), detectándose que la presencia de



visitantes puede llegar a incrementar los procesos de corrosión mas de 78 veces en comparación con los naturales.

El conocimiento del microclima e hidroquímica del sistema kárstico también es de gran utilidad en los procesos de biodeterioro. Los últimos datos obtenidos han puesto de manifiesto que las comunidades microbiológicas que colonizan la roca soporte de la cavidad ven favorecido su desarrollo bajo condiciones de alta humedad y CO<sub>2</sub> ambiental (Cañaveras *et al.*, 2001). Como se comentó anteriormente, la colonización biológica es una de los grandes problemas en la preservación de representaciones artísticas en ambientes hipogeos. Los microorganismos controlan o inducen dos procesos principales de biodeterioro (Cañaveras *et al.*, 2001): procesos destructivos que causan la desintegración parcial o total de la superficie del sustrato (roca encajante, espeleotemas o pigmentos); y procesos constructivos (formación de biofilms y/o tipos específicos de espeleotemas) que cubren o deterioran el sustrato. Cálculos geoquímicos basados en datos microclimáticos e hidroquímicos han permitido establecer un origen bioinducido (relacionados con la actividad metabólica de actinomicetos) de los espeleotemas compuestos de hidromagnesita reconocidos en la sala de Polícromos y otras salas de la Cueva de Altamira (Cañaveras *et al.*, 1999).

## CONCLUSIONES

El sistema de adquisición automatizada de datos microambientales permite un seguimiento en continuo, detallado y de alta precisión de los parámetros microclimáticos en sistemas kársticos. La temperatura del aire en la zona interna de la cueva es muy homogénea con una variación anual de 1.6°C, de los cuales un 15% es inducido por la entrada de los visitantes. Se observa un fenómeno de inversión térmica respecto a la temperatura exterior (temperatura mínima a principios del verano) relacionado con la inercia térmica de la roca encajante del karst. Las máximas concentraciones de CO<sub>2</sub> en aire son próximas a las 6000 ppmv durante el invierno. Por el contrario, los valores más bajos de la concentración de CO<sub>2</sub> en aire de la cueva se producen durante la época estival. Esta etapa de valores mínimos en el CO<sub>2</sub> de la atmósfera interior de la cueva coinciden con un período de estabilidad en la presión atmosférica de valores mínimos en la concentración en <sup>222</sup>Rn y de valores máximos en la diferencia de temperaturas entre el exterior y el interior de la cueva. La diferencia de temperaturas entre el interior y el exterior de la cueva es un parámetro determinante en los intercambios gaseosos entre el sistema kárstico y la atmósfera exterior. Los visitantes producen un incremento medio diario

de 500 ppmv, hecho que unido a los incrementos de temperatura y al mantenimiento de la humedad relativa del aire en la cueva próxima a la saturación durante todo el año favorece el desarrollo de los procesos de microcorrosión de la roca soporte de las pinturas.

**Agradecimientos:** Dedicado al Dr. D. Manuel Hoyos, a su amplia labor en los estudios de sistemas kársticos y a su incalculable conocimiento en estos temas. Este trabajo se ha financiado con el Proyecto ENV4-CT95-0104 de la Unión Europea y una beca postdoctoral (S.S.-M.) de la Comunidad Autónoma de Madrid. Es una contribución al PICG nº448 (Correlación mundial de ecosistemas kársticos) y a la INQUA Commission on Carbon. Agradecemos a J.A. Lasheras, Director del Centro de Investigaciones y Museo de Altamira la colaboración y facilidades prestadas para su realización.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrieux, C. (1974) Premier résultats sur l'étude du climat de la salle des peintures de la galerie Clastres (Niaux-Ariège). *Ann. Speleol.* **29**(1), 3-25.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Laiz, L., Groth, I. Schumann, P., González, I., Saiz-Jiménez, C. (1999) Microbial communities associated to hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Spain). *Geomicrobiol. J.* **16**, 9-25.
- Cañaveras, J.C., Sánchez-Moral, S., Soler, V., Saiz-Jimenez, C. (2001). Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiol. J.* **18**, 223-240.
- Cigna, A.A. (1993) Environmental management of tourist caves. *Environ. Geol.* **21**, 173-180.
- Ek C., Gewalt, M. (1985) Carbon dioxide in cave atmospheres. New results in Belgium and comparison with some other countries. *Earth Surf. Proc. Land.* **10**, 173-187.
- Fernández, P.L., Gutiérrez, I., Quindós, L.S., Soto, J., Villar, E. (1986) Natural ventilation of the Paintings Room in the Altamira cave. *Nature* **321** (6070), 586-588.
- Hoyos, M. (1993) Procesos de alteración de soporte y pintura en diferentes cuevas con arte rupestre del Norte de España: Santimamiñe, Arenaza, Altamira y Llonín. En Fortea, J. (Ed.): La protección y conservación del arte rupestre paleolítico. Principado de Asturias: 51-74.
- Hoyos, M., Soler, V.; Cañaveras, J.C.; Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E. (1998) Micro-climatic characterization of a karst system. Human impact on micro-environmental parameters of a prehistoric rock art cave (Candamo Cave, Spain). *Environ. Geol.* **33**/4, 231-242.

- Sánchez-Moral, S; Cañaveras, J.C.; Sanz-Rubio, E.; Soler, V.; Van Grieken, R.; Gysels, K. (1999) Inorganic deterioration affecting Altamira Cave. Quantitative approach to wall corrosion (solution etching) processes induced by visitors. *Sci. Tot. Environ.* **243**, 67-84.
- Soler, V.; Sánchez-Moral, S.; Cañaveras, J.C.; Sanz-Rubio, E.; Lasheras, J.A.; Lario, J. (1999) Microenvironmental monitoring system at Altamira cave (northern Spain). En: Guarino, A; Ferrari, A. (Eds.): Science and Technology for the Safeguard of Cultural Heritage in the Mediterranean Basin: 304.
- Villar, E., Bonet, A., Diaz-Caneja, B., Fernandez, P.L., Gutierrez, I., Quindos, L.S., Solana, J.R., Soto, J. (1984) Influencia de la presencia de personas sobre los procesos de deterioro de las pinturas de Altamira. Criterios de Conservación. Monografía del C.I.M. de Altamira nº 11. Ministerio de Cultura: 95-110.
- Wilkening M.H., Watkins, D.E. (1976) Air exchange and  $^{222}\text{Rn}$  concentrations in the Carlsbad caverns. *Health Phys.* **31**, 139-145.



# ALTERACIÓN DEL GRANITO POR ACCIÓN DE LOS LÍQUENES. ASPECTOS BIOGEOFÍSICOS Y BIOGEOQUÍMICOS

B. Prieto; T. Rivas y B. Silva

*Departamento de Edafología y Química Agrícola.  
Universidad de Santiago de Compostela. España*

## RESUMEN

En este trabajo se analizan los aspectos biogeofísicos y biogeoquímicos de la acción de los líquenes sobre rocas graníticas tomando como base un amplio estudio realizado sobre más de veinticinco monumentos graníticos pertenecientes al Patrimonio Histórico-Artístico de Galicia. Los resultados obtenidos en dicho estudio se comparan, además, con los de otros autores, con el objeto de realizar una síntesis de los conocimientos actuales del tema.

**Palabras clave:** Alteración biogeofísica, alteración biogeoquímica, biodeterioro, granito, líquenes.

Entre los distintos materiales empleados por el hombre como medio de expresión de su creatividad artística la piedra es, debido a su propia naturaleza, uno de los que mejor soporta el paso del tiempo. Sin embargo, a pesar de su resistencia, muchas de sus características iniciales se ven modificadas a lo largo de los años como consecuencia de los procesos de alteración que todo material expuesto a la intemperie sufre. Entre estos procesos de alteración, aquellos que son provocados por organismos vivos han sido objeto de un estudio más profundo en los últimos años debido al avance tecnológico, que ha supuesto la aparición de nuevos métodos que permiten un análisis más puntual de las muestras.

El estudio de la alteración de las rocas provocada por organismos vivos ha sido realizado principalmente sobre rocas calizas, siendo muy pocos los trabajos en los que se aborda la problemática del biodeterioro del granito como material de construcción. Además, si de entre los posibles organismos colonizadores del granito, hablamos de la acción de los líquenes el número de trabajos publicados se reduce a poco más de cincuenta. Ésta es la razón por la cual en el presente trabajo se pretende recoger toda la información existente hasta el momento en cuanto a la alteración a la que dan lugar los líquenes sobre el granito, tomando como base un amplio estudio realizado sobre más de veinticinco monumentos graníticos pertenecientes al Patrimonio

Histórico-Artístico de Galicia (noroeste de España) (Prieto, 1997; Prieto *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1999a-c, 2000; Silva *et al.*, 1997, 1999), y establecer la comparación con los resultados de otros autores, así como realizar una síntesis de los conocimientos actuales en este tema.

Desde siempre se ha reconocido la importancia de los líquenes en la formación del suelo. La edafogénesis comienza con la alteración de la roca para generar un protosuelo y los mecanismos a través de los cuales se origina éste son los mismos que los que ocurren en las rocas de los monumentos. Así, estos procesos pueden ser divididos en biogeofísicos, que tienen lugar a través del contacto íntimo entre el talo del líquen y la roca, y biogeoquímicos, a través de los productos excretados por dichos organismos, y la actuación conjunta de ambos procesos dan lugar a alteraciones físicas, químicas y mineralógicas.

### **Alteraciones físicas**

El análisis micromorfológico de la interfaz líquen-granito reveló que en la mayoría de los casos tiene lugar una alteración biogeofísica provocada por la penetración, expansión y contracción del talo líquénico. La profundidad de penetración dentro de la roca es variable, pero en ningún caso sobrepasa los 5 mm. Esta diferente profundidad es debida a las características físicas propias de cada tipo de granito, particularmente al tipo y distribución de la porosidad y fisuración. Así, en granitos en los que la fisuración es intensa y sigue una dirección paralela a la superficie, las hifas avanzan en sentido horizontal siendo la profundidad alcanzada escasa, mientras que en granitos en los que la porosidad es homogénea en todas las direcciones, la profundidad alcanzada es mayor.

En general, se admite que la penetración de los líquenes en los diferentes sustratos rocosos depende de la composición mineralógica del sustrato y también del tipo de talo (folioso o crustáceo, epilítico o endolítico), e incluso, de la especie (Nimis *et al.*, 1992). En el caso del granito, también se constató diferente grado de penetración entre líquenes foliáceos y crustáceos. En cualquier caso, los líquenes foliáceos también penetran en la roca (Figura 1A), contradiciendo así a Jaton *et al.* (1985), quienes mantenían que este tipo de líquenes únicamente forman un recubrimiento superficial, sin ninguna inserción en el sustrato. Este avance de las estructuras de líquenes foliaceos en granito fue también detectado por Romao y Rattazzi (1996) y Wierzchos y Ascaso (1996).

El avance de las hifas en el granito ocurre preferentemente por los huecos intergranulares de la misma manera que la señalada por Wierzchos y Ascaso (1994). Sin embargo, también se ha observado como aquellos minerales que presentan planos de exfoliación marcados, tales como la biotita, moscovita y feldespatos, son además



atravesados intragranularmente por las hifas, mientras que otros son únicamente rodeados por éstas. En el caso de las micas, el avance intragranular de las hifas paralelamente al plano 001 es muy llamativo ya que llega incluso a provocar la completa separación de las láminas. Un caso espectacular a este respecto es el que se muestra en la Figura 1B en donde se observa un cristal de moscovita completamente fracturado como resultado de la colmatación de los huecos por las estructuras líquénicas (la mayoría de las referencias bibliográficas se refieren a la biotita, no se han encontrado ninguna que haga referencia a la moscovita).

La capacidad del liquen para generar nuevas vías de acceso a través de los granos minerales en las rocas graníticas fue también notada por Salvadori y Lazzarini (1991), Ascaso y Wierzchos (1994a, 1994b, 1996), Wierzchos y Ascaso (1994, 1996, 1998) y Romao y Rattazzi (1996). Del Monte *et al.* (1996) proponen un orden de susceptibilidad de los minerales a ser atravesados por las hifas, siendo éste, desde el mineral que ofrece una menor resistencia al avance de las hifas hasta el más resistente: plagioclasa Ca-Na, plagioclasas Na, biotita y feldespato potásico. Sin embargo, en el caso de las muestras estudiadas en Galicia, no se apreciaron diferencias entre estos minerales.

La gran capacidad que tienen los líquenes para acumular agua en el talo (100-300% de su peso seco (Bell *et al.*, 1993)) hace que la alternancia de periodos secos y húmedos sea de gran importancia en el deterioro que pueden producir puesto que cuando el talo se expande ejerce fuertes presiones sobre el sustrato en el cual penetra. Mediante este mecanismo se van desprendiendo los granos minerales de la superficie en contacto con el liquen, dando lugar a una desintegración mecánica de la roca. Este fenómeno se observó claramente en muestras graníticas en las que las fisuras superficiales aparecen totalmente colmatadas por las estructuras líquénicas originando una intensa microfisuración de algunos cristales. Además, los ciclos de expansión-contracción del talo también pueden dar lugar a la formación de ampollas, es decir a separaciones superficiales paralelas a la superficie de la roca. Así, se observaron ampollas de 0.7 mm de grosor, 3.1 mm de longitud y 0.3 mm de altura (Figura 1C).

Los cristales que, como consecuencia de la actuación de los procesos antes citados, son separados de la interfaz son englobados por el talo de tal modo que a medida que éste va creciendo los cristales pierden todo contacto con la superficie de la roca siendo "asimilados" por el liquen de tal modo que verdaderamente parece que forman parte de él. Este hecho fue también constatado por Ascaso y Wierzchos (1994b) y Wierzchos y Ascaso (1994) en líquenes sobre granito y por Ariño *et al.* (1995) en arenisca. Estos autores determinaron además el



contenido en materia mineral de esos líquenes siendo de 25 y 30 mg.cm<sup>-2</sup>, respectivamente.

Con respecto a este último fenómeno, la asimilación por el talo de minerales, llama la atención que ocurra también en el caso de *Xanthoria parietina* (Figuras 1E y F) por ser éste un líquen foliáceo. En los líquenes crustáceos la parte que está en contacto con la roca es la médula, formada por hifas fúngicas débilmente gelatinizadas, de manera que cuando se desprende un grano de la superficie rocosa, éste se queda atrapado en la médula. Sin embargo, en el caso de los líquenes foliáceos el talo posee además un cortex inferior que hace que la médula no esté en contacto directo con la roca; estos líquenes se unen a la superficie de la roca en puntos muy concretos por medio de rizinas. Las rizinas pueden provocar la separación de los granos de la superficie, hecho que se observó claramente, pero su inclusión en la médula es mucho más difícil de explicar.

Algunos autores han afirmado que los cristales englobados en el talo liquénico no proceden necesariamente de la roca que les sirve de soporte sino que pueden haber llegado al líquen por vía aérea o a través del agua dando lugar a lo que se denomina contaminación cruzada (Adamo et al 1993, Wilson et al 1981). En el caso de las muestras graníticas analizadas, la forma de los minerales englobados, con frecuencia coincidente con el contorno de la superficie de la roca, indica que proceden directamente de ésta (Figura 1D), pero también, como ya se verá más adelante, existen cristales de neoformación.

## **Alteraciones químicas**

Con el objeto de analizar la posible alteración química provocada por los líquenes sobre granitos, teniendo en cuenta que la bioconcentración local de elementos ocurre en los sitios activos (Robert y Berthelin, 1986), y con el objeto de establecer comparaciones, las muestras de granito colonizado por diferentes líquenes fueron divididas en tres fracciones: talo, interfaz roca-liquen (capa superficial, de 0-2 cm, de la roca en contacto con el líquen) y la parte interior de la roca (al menos 4 cm por debajo de la superficie) que se considera que no está afectada por la actividad liquénica. Además se tomó muestra de una cuarta fracción que se corresponde con un área superficial no colonizada y afectada únicamente por la alteración atmosférica; esto se hizo con el objeto de establecer comparaciones entre el biodeterioro provocado por los líquenes y la alteración inducida por los agentes atmosféricos.

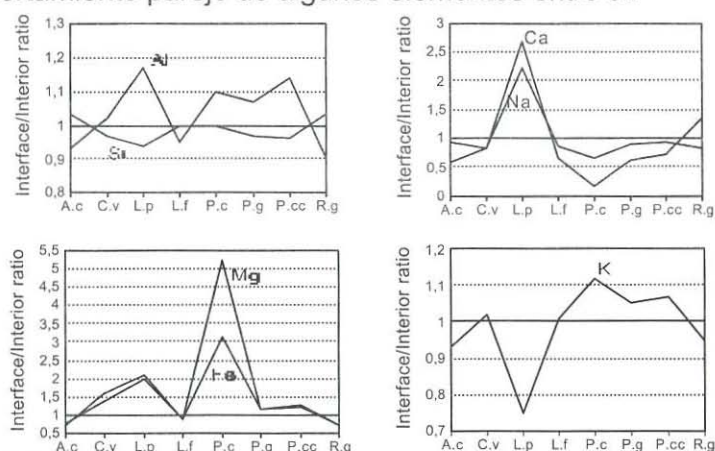
Cada una de estas fracciones fue sometida a una digestión ácida con una mezcla 2:2:1 de ácido fluorhídrico, nítrico y sulfúrico en un reactor a presión (0.2g:12.5ml; 150 psi, 20 min.). Una vez fríos los extractos se añadieron 50 ml de ácido bórico a saturación y se continuó

la digestión durante 10 minutos más a 60 psi. Este método de digestión fue utilizado de igual manera en las muestras de roca y de talo con el objeto de que los resultados fueran perfectamente comparables. A este respecto, se usa un método de digestión más agresivo que el que normalmente se emplea para materia vegetal ya que, como se vio anteriormente, el talo engloba pequeños granos minerales que es preciso disolver.

En el extracto resultante se determinaron Si, Al, Fe, Ca y Mg por espectrofotometría de absorción atómica y Na y K por espectrofotometría de emisión.

Para evaluar en qué medida los líquenes inducen modificaciones en la composición química de la roca, se calculó la relación entre el porcentaje de cada elemento en la interfaz roca-liquen y en la muestra correspondiente tomada en el interior de la roca, considerando este último valor como referencia a efectos de composición química de la roca inalterada. A partir de datos químicos obtenidos para granitos sanos y alterados en Galicia (Rivas, 1997; Taboada, 1992), se deduce que una relación mayor o menor de 1 en 0.1 unidades, indica que la roca ha sido alterada.

Así, la Figura 2 muestra que los líquenes no afectan al contenido de Si en las muestras graníticas, mientras que para el resto de los elementos se detectan variaciones de Al en las muestras colonizadas por *Lecanora polytropia* y *Pertusaria coccodes*, de Fe y Mg en las muestras de *Aspicilia cinerea*, *Candelariella vitellina*, *Lecanora polytropia*, *Parmelia conspersa* y *Rhizocarpon geographicum*, de Ca en todas las muestras, de Na en *Candelariella vitellina*, *Lecanora polytropia*, *Lecidea fuscoatra*, *Parmelia conspersa* y *Rhizocarpon geographicum*, y de K en *Lecanora polytropia* y *Parmelia conspersa*. Se observó además un comportamiento parejo de algunos elementos entre sí.



**Figura 2:** Relación interfaz/interior de la roca del contenido de los distintos elementos en muestras graníticas colonizadas por *Aspicilia cinerea* (A.c), *Candelariella vitellina* (C.v), *Lecanora polytropia* (L.p), *Lecidea fuscoatra* (L.f), *Parmelia conspersa* (P.c), *Parmelia glabrata* (P.g), *Pertusaria coccodes* (P.cc) y *Rhizocarpon geographicum* (R.g).



Así el aluminio y potasio mostraron, en cinco de las ocho muestras analizadas, un aumento relativo en la interfaz, que se podría explicar por ser estos elementos los constituyentes principales de dos minerales resistentes del granito, como son la moscovita y el feldespato potásico (por tanto, este aumento relativo podría simplemente ser debido a la permanencia de estos elementos mientras que el resto son lavados).

Para el resto de los elementos, las diferencias entre sus concentraciones en la interfaz y en el interior de la roca son mayores. El hierro y el magnesio mostraron también un comportamiento similar, lo cual es debido a que ambos proceden exclusivamente del mismo mineral, la biotita, presentando ambos un aumento relativo en la interfaz. Puesto que la biotita, tal y como se ha demostrado en trabajos anteriores (Prieto, 1997), es el mineral granítico más susceptible al efecto de los ácidos orgánicos, es lógico pensar que los líquenes actúan sobre ella. El incremento de la concentración de Fe en la interfaz roca-líquen está de acuerdo con el comportamiento geoquímico del Fe: este elemento no debería de perderse puesto que es susceptible de oxidarse para formar oxihidróxidos o complejos insolubles; de hecho, el hierro es uno de los elementos menos móviles y en los procesos de alteración siempre ocurre un aumento relativo de este elemento en los frentes de alteración. En el caso del magnesio, su retención únicamente puede ser explicada por un cierto efecto protector del talo que impide un lavado efectivo de este elemento.

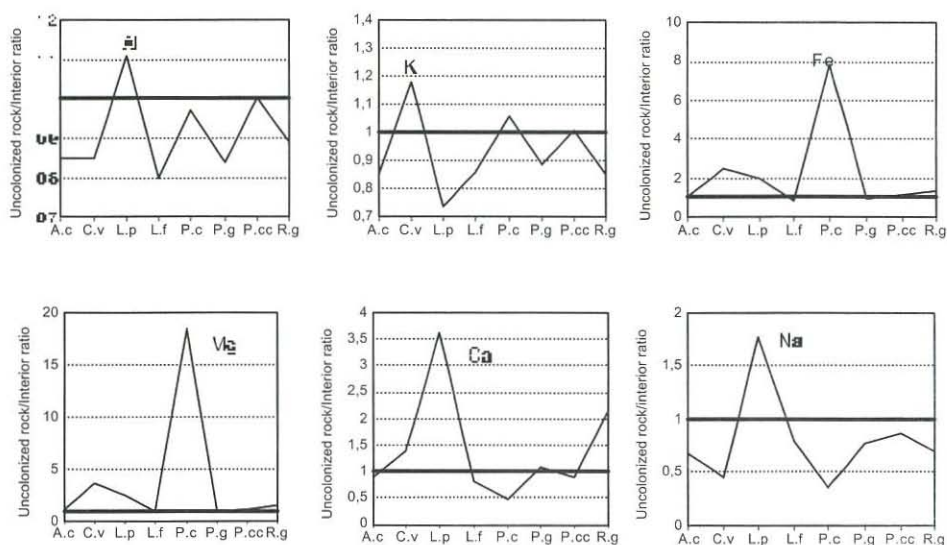
El Ca y Na presentaron también un comportamiento paralelo, siendo movilizados desde la interfaz por lo que sus concentraciones en la interfaz disminuyeron con respecto al nivel de referencia. Ambos elementos se encuentran en las plagioclasas, indicándonos pues una actuación de los líquenes sobre dichos minerales, los más alterables del granito.

Debemos mencionar que, tal y como se observa en las figuras 2 y 3, en muestras colonizadas por algunos líquenes la variación de la concentración de la mayoría de los elementos no sigue la tendencia habitual o bien es mayor que para el resto de las muestras. Este comportamiento excepcional podría atribuirse a las variaciones en cantidad y variedad de ácidos líquénicos presentes en cada especie, si bien este es un aspecto que hasta el momento no está muy estudiado.

Para diferenciar entre la alteración provocada por los líquenes y la alteración atmosférica se analizó la relación entre la concentración de cada elemento en la superficie de la roca sin colonizar y la concentración en el interior de la roca (Figura 3) y así conocer la alteración geoquímica provocada por el efecto de la intemperie. Con excepción del Al y K, la variación de elementos en la superficie sin colonizar es similar a la encontrada en la interfaz. En el caso de estos

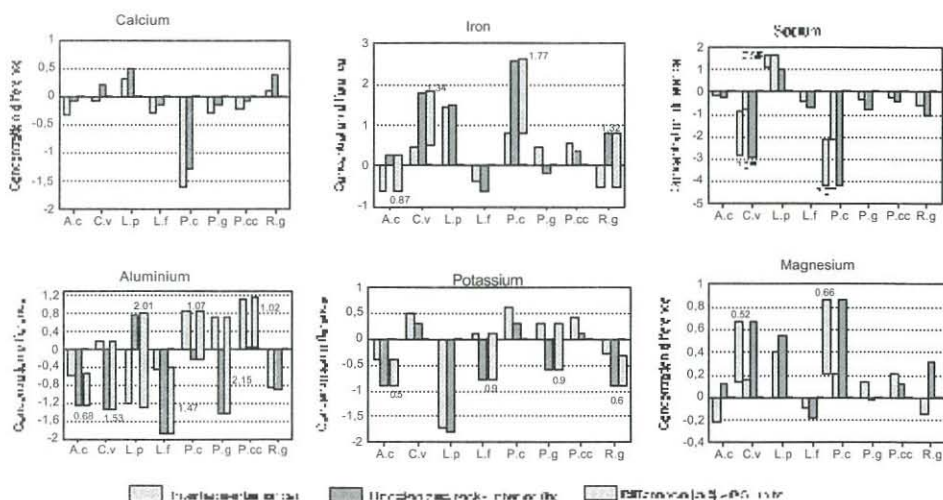


dos elementos la relación superficie sin colonizar/interior es contraria a la relación interfaz/interior, siendo menores los porcentajes de estos elementos en la superficie sin colonizar que en la colonizada.



**Figura 3:** Relación superficie de la roca sin colonizar/interior de la roca del contenido de los distintos elementos en muestras graníticas colonizadas por *Aspicilia cinerea* (A.c), *Candelariella vitellina* (C.v), *Lecanora polytropia* (L.p), *Lecidea fuscoatra* (L.f), *Parmelia conspersa* (P.c), *Parmelia glabratula* (P.g), *Pertusaria coccodes* (P.cc) y *Rhizocarpon geographicum* (R.g).

Para determinar si los líquenes y los agentes atmosféricos alteran la roca en la misma medida y actuando sobre los mismos elementos, se calcularon para cada elemento las diferencias entre las concentraciones en la interfaz y el interior de la roca y entre la superficie sin colonizar y el interior. Para diferencias menores de 0.5 unidades (valor obtenido a partir de Rivas, 1997 y Taboada, 1992) puede considerarse que la alteración debida a los líquenes y a la atmósfera es igual; en caso contrario las diferencias se muestran en la Figura 4. Así, únicamente en el caso del Ca su movilidad fue similarmente afectada por la atmósfera y por los líquenes en todas las muestras. Todos los líquenes analizados, excepto *Rhizocarpon geographicum* afectan a la movilidad del Al; *Aspicilia cinerea*, *Candelariella vitellina*, *Parmelia conspersa* y *Rhizocarpon geographicum* afectan a la movilidad del Fe; *Aspicilia cinerea*, *Lecidea fuscoatra*, *Parmelia glabratula* y *Rhizocarpon geographicum* afectan a la movilidad del K; *Candelariella vitellina*, *Lecanora polytropia* y *Parmelia conspersa* a la del Na; y *Candelariella vitellina* y *Parmelia conspersa* a la del Mg.



**Figura 4:** Diferencias entre las concentraciones de los distintos elementos en la interfaz y el interior de la roca y entre la superficie de la roca sin colonizar y el interior en muestras de granito colonizadas por *Aspicilia cinerea* (A.c.), *Candelariella vitellina* (C.v.), *Lecanora polytropia* (L.p.), *Lecidea fuscoatra* (L.f.), *Parmelia conspersa* (P.c.), *Parmelia glabrata* (P.g.), *Pertusaria coccodes* (P.cc.) y *Rhizocarpon geographicum* (R.g.).

Además, el efecto de los líquenes en la movilización de elementos fue mayor para el Fe y Al. En general, la concentración de Al en la interfaz aumenta con respecto a la del interior de la roca, mientras que la concentración en la superficie sin colonizar disminuye con respecto a este valor. Tal y como se mencionó anteriormente, este mismo comportamiento se observó también en el K.

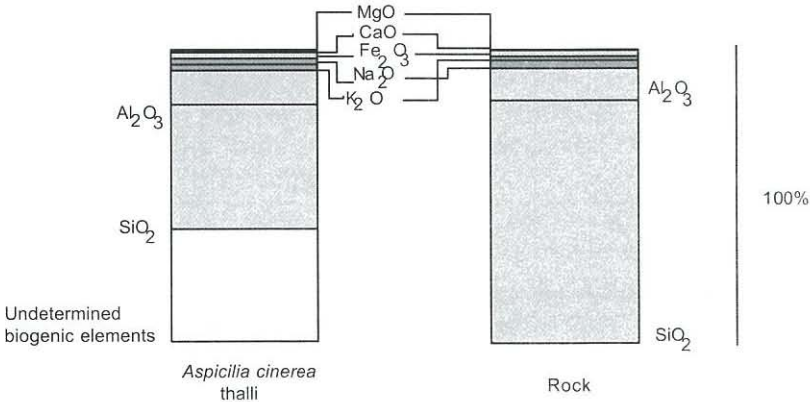
En el caso del Fe y Mg, estos elementos se comportan de igual manera en ambas superficies, es decir permanecen retenidos en las zonas superficiales de la roca, siendo mayor la cantidad de estos elementos en la superficie sin colonizar que en la interfaz. La acumulación relativa de hierro en las superficies, ha sido explicada anteriormente pudiendo atribuirse a la mayor oxigenación que sufre la superficie sin colonizar con respecto a la interfaz el porcentaje de hierro más elevado en esta superficie.

El sodio, que como ya habíamos visto tiende a moverse desde la interfaz, también lo hace desde la superficie sin colonizar, pero con mayor intensidad, indicando que el líquen por su efecto protector puede estar aminorando la lixiviación de los elementos más solubles.

Sin embargo, el Ca es el único elemento en el que apenas existen diferencias entre lo que ocurre en la superficie sin colonizar y en la

interfaz. Esto en principio parece sorprendente puesto que, como se verá más adelante, el liquen asimila Ca de la roca. La explicación a estos hechos aparentemente contradictorios puede ser que mientras que en la superficie sin colonizar el calcio se pierde por lavado, en la interfaz el Ca es asimilado por el liquen pasando a formar parte del talo, de manera que aunque los mecanismos de sustracción a partir de la roca sean diferentes el resultado final puede ser el mismo.

Por otra parte, el estudio de la fracción talo ha puesto de manifiesto que una gran parte de ella (%) está compuesta por los mismos elementos que la roca, guardando entre ellos relaciones similares a las que existen en el granito (Figura 5). Este hecho corrobora los resultados obtenidos en el apartado anterior de alteración física en el que se vio que las hifas de los líquenes pueden disgregar la roca y englobar en su talos granos minerales. Según esto podemos definir la presencia en el interior del talo de una zona de transición entre el talo propiamente dicho y la interfaz, que denominaremos “interfase” por poseer ésta características propias del talo y de la roca, al existir en ella una íntima relación entre los componentes líquénicos y los minerales.



**Figura 5:** Porcentaje de los distintos elementos en el talo de *Aspicilia cinerea* colonizando granito y en una muestra de una zona superficial del mismo granito no colonizada.

### Alteración mineralógica

El análisis de varias muestras colonizadas por líquenes por medio de difracción de rayos X, espectroscopia Raman y SEM-EDAX ha permitido determinar que las transformaciones mineralógicas del granito provocadas por líquenes ocurren a partir de los siguientes procesos:



### **a) Formación de caolinita y vermiculita hidroxialumínica**

En el conjunto de las muestras, en general, se identificaron los productos de alteración del granito más comunes: caolinita y vermiculita. Análisis de las muestras saturadas en potasio indicaron que estas vermiculitas son hidroxialumínicas, minerales éstos ampliamente citados como productos típicos de la transformación de las biotitas en medio ácido y en presencia de materia orgánica (Mortland *et al.*, 1956; Vicente *et al.*, 1977; Robert y Berthelin, 1986). A partir del estudio de las diferentes fracciones de las muestras se observó que estos minerales de alteración, caolinita y/o vermiculita, son más abundantes en la interfaz. La mayor presencia de vermiculita hidroxialumínica en la interfaz puede atribuirse a que el descenso de pH provocado por las sustancias ácidas segregadas por los líquenes favorece la sustitución de iones  $K^+$  de la intercapa por formas hidroxiladas de aluminio. Sin embargo, la mayor abundancia de caolinita en la interfaz de las muestras no tiene porque ser necesariamente debida a la acción de los ácidos liquénicos sino que puede ser atribuida a una menor erosión de la interfaz, en relación con la superficie sin colonizar, debido a la protección física ejercida por el liquen, de manera que mientras que en la superficie sin colonizar los granos argilizados son más susceptibles a la erosión y por tanto la caolinita se pierde, en la interfaz permanece debido al efecto protector del talo liquénico.

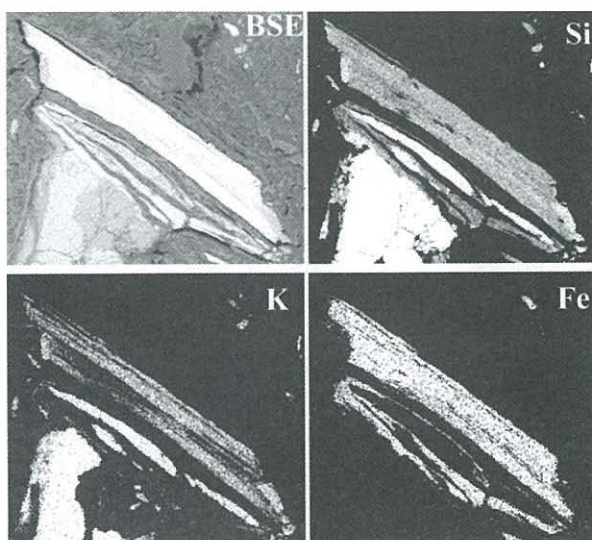
La presencia de este mineral también puede interpretarse como un efecto indirecto del liquen ya que, por una parte, mantienen la humedad haciendo que el tiempo de contacto de la roca con las disoluciones de ataque sea mayor y, por tanto, la hidrólisis será más activa. Se ha comprobado que una superficie colonizada por líquenes permanece 2,5 veces más tiempo húmeda que una superficie no colonizada (Bell *et al.*, 1993). Por otra parte, la excreción de ácidos favorece la hidrólisis, pues es sabido que muchos minerales sólo sufren este proceso en medio ácido.

La formación de minerales de arcilla en granito ha sido atribuida en varias ocasiones a la acción de este tipo de ácidos. Así, por ejemplo Ascaso *et al.* (1976) y Ascaso (1985) aportan datos de la formación de caolinita y haloisita debida a la acción de *Parmelia conspersa* sobre granito, y de haloisita por *Rhizocarpon geographicum*, mientras que Wilson (1995) mantiene que la cuestión de si los minerales de arcilla presentes en la interfaz roca-liquen son o no formados por el liquen permanece todavía sin resolver.

Sin embargo, en el caso de los líquenes *Tephromela atra* y *Ochrolechia parella* colonizando el mismo granito, si existen evidencias de que la alteración de la biotita se debe a la acción liquénica, ya que en el mapa de distribución de elementos (Figura 6) realizado mediante

SEM-EDS en la modalidad de electrones retrodispersados, se observó que el líquen provoca una disminución del K del espacio interlaminar de la biotita en aquellas zonas en las que las hifas están en contacto directo con el mineral. Esto coincide con los experimentos de Jones *et al.* (1981) los cuales mantienen que, sobre biotita, el ataque biológico empieza en los bordes de las láminas y va avanzando hacia el centro.

Una pérdida de potasio de este tipo, en biotitas de granito, fue también citada por Ascaso y Wierzbos (1996).



**Figura 6:** Mapa de distribución de silicio, potasio y hierro en un cristal de biotita en el que se aprecia una disminución de la cantidad de potasio del espacio interlaminar en las zonas de contacto líquen-mineral.

La formación de vermiculita hidroxialumínica se explica porque los iones K eliminados del espacio interlaminar son sustituidos por iones aluminio hidroxilado que se producen en abundancia en la alteración de los aluminosilicatos cuando el medio es ligeramente ácido. Pueden proceder incluso de las posiciones tetraédricas u octaédricas de la biotita, de donde son extraídos por efecto de los ácidos orgánicos.

La preferencia del líquen por este mineral, y en concreto por el potasio, no es de extrañar ya que se sabe que las micas son unos de los principales minerales a partir de los cuales las plantas consiguen el potasio necesario para su desarrollo. La facilidad para la pérdida de potasio depende en gran medida de la estructura de la mica de manera que las dioctaédricas (moscovita) son más resistentes a la extracción de este elemento que las trioctaédricas (biotitas) (Dreher y Niederbudde, 1994).



Debemos notar que en el apartado anterior de alteración química, se constató un aumento relativo de K en la interfaz, lo cual podría estar en contradicción con la pérdida detectada por SEM-EDS. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el K detectado por digestión ácida y análisis total se refiere al potasio total de la interfaz mientras que por SEM analizamos exactamente lo que ocurre en los cristales de biotita, por lo que aun así, y teniendo en cuenta que minerales con potasio como la moscovita y el feldespato potásico son muy resistentes, es posible que ocurra un aumento relativo del potasio total en la interfaz.

Sin embargo, no queremos dejar de notar que existen algunas referencias bibliográficas que indican que la alteración de la biotita por la actividad biológica no da lugar a la expansión de la intercapa, lo que sí ocurrió cuando la biotita fue tratada con soluciones salinas (Boyle *et al.*, 1967)

### **b) Formación de geles de sílice**

Por difracción de rayos X se detectó la presencia de geles de sílice que se manifiestan como un efecto mal definido a una distancia de 0,45 nm. En las muestras en las que se detectaron, éstos aparecieron siempre en la interfaz y/o en el interior del talo.

La presencia de este tipo de geles ha sido notificada por varios autores. Así, Robert y Berthelin (1986) afirman que, para rocas silicatadas, los micrositios con organismos vivos siempre presentan precipitación con compuestos pobremente cristalizados, incluyendo compuestos de Fe y fases Si-Al-Fe. Similarmente, Wilson *et al.* (1981), Jones *et al.* (1981) y Adamo *et al.* (1993) confirman la ausencia de compuestos cristalinos y la presencia de geles ricos en Si bajo líquenes colonizadores de serpentinita, al igual que Salvadori y Lazzarini (1991) los detectan en la interfaz de *Lecanora muralis-arenisca*.

Es por tanto la presencia de geles de Si una de las principales características que nos permite diferenciar la alteración debida al ataque biológico de la alteración debida a la meteorización, puesto que en la primera, la intervención de los organismos, a través de la materia orgánica y de ácidos complejantes, provoca una ralentización o inhibición de los procesos de cristalización (Wilson y Jones, 1983). Así en el caso de los líquenes analizados, podemos decir que *Aspicilia cinerea*, *Candelariella vitellina*, *Lecanora polytropia*, *Ochrolechia parella*, *Parmelia conspersa*, *P. glabratula*, *Pertusaria coccodes*, *P. leucosora* y *Rhizocarpon geographicum* tiene una participación activa en la alteración del granito ya que dan lugar a la formación de geles de sílice.



**c) Neoformación de minerales: oxalato cálcico, oxalato magnésico, carbonato cálcico y yeso.**

La causa de neoformación de minerales por seres vivos debe buscarse en su propio metabolismo pues ha sido demostrado que son varios los organismos que utilizan el mecanismo basado en la formación de un mineral para deshacerse de los elementos que se encuentren en concentraciones que puedan ser tóxicas para ellos (Man *et al.* 1989). Así, en el caso de los líquenes, la biomineralización ocurriría principalmente debido a la segregación de ácidos orgánicos por parte del hongo (Jones y Wilson, 1986), dando lugar a la precipitación de sales insolubles en el talo liquénico.

La capacidad de los líquenes para producir ácido oxálico a través del micobionte, como producto primario de los procesos bioquímicos, fue demostrada por varios autores (Herderson y Duff, 1963; Jones *et al.*, 1980, Wilson *et al.* 1981). Este ácido, que no es exclusivo de los líquenes sino que es común a todos los organismos como producto intermedio del ciclo de Krebs, es muy soluble en agua y actúa como quelante de iones metálicos dando lugar a oxalatos cuya naturaleza está relacionada con la composición química del sustrato (Jones y Wilson, 1986; Seaward y Giacobbin, 1988; Edwards y Seaward, 1995). Esta relación entre el sustrato y el tipo de oxalato formado se puede entender como una evidencia de que el líquen actúa sobre el sustrato alterándolo, mediante la toma de elementos.

Este mecanismo de neoformación ha sido propuesto por diversos autores en el caso de líquenes en presencia de altas concentraciones de calcio (Syers y Iskandar, 1973), magnesio (Wilson *et al.*, 1980), manganeso (Wilson y Jones, 1984),  $\text{Fe}^{3+}$  (Ascaso *et al.*, 1982) y cobre (Purvis, 1984), formándose los oxalatos correspondientes, que son mucho menos solubles que otras sales de estos elementos y que se acumulan en la interfaz roca-líquén (Ascaso *et al.* 1982), dentro del talo (Chisholm *et al.*, 1987) e incluso sobre la superficie del líquen formando eflorescencias (Wadsten y Moberg, 1985).

Entre los oxalatos, los más abundantes en los líquenes son el oxalato cálcico monohidratado y dihidratado (los minerales whewellita y weddellita respectivamente); estos minerales fueron encontrados en líquenes colonizando granito por Jones *et al.* (1981), Ascaso y Wierzchos (1994 a y b), Prieto *et al.* (1994, 1995), Wierzchos y Ascaso (1994).

Syers y Iskandar (1973) indicaron que la formación de estos oxalatos cálcicos hace disminuir la concentración de Ca de la disolución en el área en contacto inmediato con el talo liquénico, lo cual, por otra parte, provoca la disolución de carbonato cálcico en rocas calizas. Por tanto el ácido oxálico tendría una función reguladora de la concentración de iones calcio en el medio. Aunque esta teoría ha sido apoyada por

algunos autores (Wilson *et al.* 1981), también se ha barajado la posibilidad contraria, es decir la formación de oxalatos cálcicos y de complejos metálicos con hierro ocurre para neutralizar el efecto tóxico del ácido oxálico. Esta teoría se basa en la observación de que especies de *Xanthoria* y *Umbilicaria* tienen preferencia por los minerales que contienen calcio (plagioclasa) y por los depósitos de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Bech-Andersen 1987). Otros autores apuntan a que ambas teorías pueden ser ciertas según los casos (Salvadori y Zitelli, 1981)

En las muestras analizadas en este estudio, excepto en un caso en el que es probable la presencia de un oxalato magnésico, los minerales biogénicos que aparecen son compuestos de calcio (whewellitita, weddellitita y carbonato cálcico). Este hecho no deja de ser llamativo en sustratos graníticos, pobres en calcio, por lo que la presencia de estos minerales nos conduce a las siguientes ideas:

- Aunque el granito, es como ya se ha dicho, una roca pobre en calcio hay que tener en cuenta que de sus minerales constituyentes es la plagioclasa el más susceptible a la alteración, y tanto más cuanto más rica en calcio sea. Es, por tanto, la alteración de este mineral la que proporciona el calcio suficiente para la formación de estos compuestos.
- Para los líquenes colonizadores del granito, la concentración de calcio que resulta tóxica y que, por tanto, provoca la excreción de ácido oxálico, sería menor que para las especies calcícolas. Con respecto a esta hipótesis, Gerloff y Fishbeck (1969) mostraron que para algunas algas verdes y cianobacterias la concentración crítica de calcio en la célula (es decir el contenido celular mínimo de calcio que permite el máximo rendimiento del organismo) es extremadamente baja, del orden del 0.06% de su peso seco. En cualquier caso, mencionamos este dato sólo a modo orientativo ya que además de no disponer de datos suficientes para extrapolar estos valores de la fisiología de algas a los líquenes, existe algún estudio (Wilson y Jones, 1984) en el que se demuestra que los líquenes tienen la capacidad para soportar niveles de metales pesados muchas veces mayores que aquellos considerados tolerables para el hongo y el alga en medio de cultivo. Sin embargo, en el caso de que esta hipótesis sea cierta, la concentración crítica de calcio para los líquenes es diferente para cada especie ya que en un estudio realizado con diferentes especies de líquenes colonizando un mismo sillar granítico de un monumento (lo que implica las mismas condiciones atmosféricas), se vio que la producción de ácido oxálico era diferente para cada especie (Prieto *et al.* 2000)

Un caso similar fue notado por Adamo *et al.* (1993), quienes sobre muestras de serpentinita encontraron grandes cantidades de oxalato



cálcico monohidratado y no un oxalato magnésico dihidratado como era de esperar. La ausencia de este mineral es atribuida al escaso contenido de humedad de la roca, sólo suficiente para formar monohidratos, ya que haciendo reaccionar en el laboratorio la misma roca con ácido oxálico, si ocurre la formación de oxalato magnésico dihidratado.

En el caso de los oxalatos cálcicos, aunque ambas formas, mono y dihidratada, tienen una amplia difusión en el mundo vegetal y en las células de muchas plantas superiores e inferiores, la forma estable parece ser el oxalato cálcico monohidratado (whewellita) de manera que, según algunos autores (Del Monte y Sabbioni, 1983), la weddellita es difícil encontrarla en afloramientos naturales o monumentos. Sin embargo, ha sido detectada por varios autores y por nosotros mismos. Además Wadsten y Moberg (1985) observaron que de 20 especies en 13 la única forma de oxalato era weddellita.

La presencia de la forma mono o dihidratada de oxalato cálcico, parece ser que depende del ambiente en el que se desarrolle el liquen. Así, Wadsten y Moberg (1985) notaron que en zonas secas los líquenes presentaban sobre su superficie una mezcla de weddellita y whewellita, mientras que en las zonas húmedas sólo aparecía whewellita (forma monohidratada). Debido a esto dichos autores postularon la hipótesis de que la formación de oxalatos cálcicos sobre el talo es un mecanismo del liquen para asegurarse una reserva de agua. Sin embargo, Salvadori y Zitelli (1981) no están de acuerdo con esta teoría ya que encuentran los dos oxalatos en varias columnas expuestas a las mismas condiciones ambientales y apuntan que la formación de uno u otro parece depender de la naturaleza química del sustrato y de sus diferentes propiedades de hidratación y solubilidad; cuando encuentran los dos oxalatos sobre el mismo sustrato rocoso justifican su presencia en base a características particulares de cada zona concreta, como pequeñas diferencias de porosidad, capilaridad, exposición, etc.

Teniendo en cuenta ambas hipótesis, nuestros datos se ajustan más a la primera, es decir, a que la formación de uno u otro tipo de oxalato depende de la necesidad que tiene el liquen de mantener una reserva de agua ya que la formación de oxalato cálcico monohidratado es la predominante, indicando que el liquen dispone de agua suficiente, como era de esperar en un clima como el gallego. Además, esta hipótesis fue corroborada en un estudio de cuatro muestras de *Ochrolechia parella* colonizando granito en distintas condiciones ambientales. Mediante FT-Raman se detectó oxalato cálcico monohidratado en las muestras localizadas en un ambiente más húmedo, mientras que el dihidratado se detectó en las muestras tomadas en un ambiente más seco (Prieto *et al*, 1999a). Además, se detectó un comportamiento fisiológico diferente del liquen, que se



traducía en una concentración diferente de pigmentos según el ambiente y según el oxalato formado. Por otro lado, se observó que en algunos casos el oxalato cálcico únicamente aparecía en los apotecios de la muestra, indicando éstos como el posible lugar de formación del oxalato.

También existen referencias bibliográficas sobre la presencia de oxalato cálcico trihidratado asociado a líquenes colonizadores de rocas carbonatadas (Gehrmann y Krumbein, 1994).

Queremos notar que la idea principal, hablando en términos de alteración, es el proceso de formación del oxalato cálcico, es decir la extracción de elementos de un mineral, con su consiguiente desestabilización, para formar otro, y no la presencia del oxalato en sí, puesto que ésta incluso puede ser beneficiosa. De hecho Matteini *et al.* (1994) proponen un método de protección de las obras de arte contra los agentes atmosféricos basado en transformar el carbonato cálcico de la superficie de las obras en whewellita, pues al ser ésta menos soluble se consigue de este modo una mayor cohesión de la superficie, una mayor resistencia a los ácidos, por tanto a la contaminación, y se reduce la porosidad sin modificar las propiedades hidrofílicas del sistema.

Teniendo en cuenta la composición del granito, también podríamos esperar la formación de oxalatos de Al o Si, sin embargo éstos, por su alta solubilidad, no precipitan.

Aún así, y tal como dice Wilson (1995), la presencia de oxalatos en el líquen no indica que el ácido oxálico haya sido el causante de la alteración, ya que el catión del oxalato puede proceder del agua de escorrentía más que de la extracción directa del sustrato (Purvis *et al.*, 1987).

En una de las muestras se han detectado unos precipitados que se han identificado teniendo en cuenta su hábito piramidal, como un posible oxalato magnésico dihidratado (glushinskita). La presencia de este oxalato en esta muestra en concreto parece lógica ya que es la única que contiene un mineral con abundante Mg, la hastingsita.

La neoformación de este mineral fue notada también por Wilson *et al.* (1980) sobre serpentinita colonizada por líquenes, y por Ascaso *et al.* (1982) en muestras de dolomita tratada en el laboratorio con ácido oxálico.

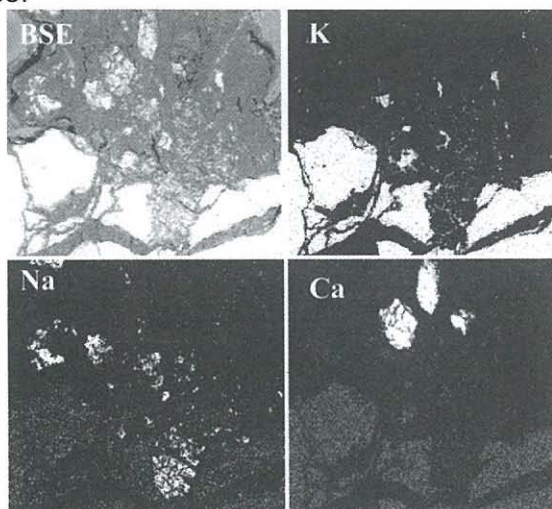
Otro de los minerales de neoformación detectado en una de las muestras líquen-granito es el carbonato cálcico. La presencia de este mineral llama la atención porque hasta el momento no había sido citado como material de neoformación en el talo de líquenes colonizadores de rocas ácidas, y además porque en comparación con el oxalato cálcico, este último tiene siempre más probabilidades de formarse por ser menos soluble, especialmente a pH ácidos (a pH 7 la solubilidad del

carbonato cálcico es 60 veces mayor que la de la whewellita, y a pH 5 es 3600 veces mayor (Matteini *et al.* 1994).

Al ser el carbonato cálcico un mineral menos hidratado que el oxalato, se podría explicar su formación si en el medio no hubiese la suficiente agua para la formación del oxalato (tal y como se dijo antes, la presencia o ausencia de agua ha sido apuntada como causa de que se forme uno u otro oxalato).

Otra posibilidad es que, en un momento dado, en un microsistema determinado, se den las condiciones de pH necesarias para que se igualen las solubilidades de ambos minerales, lo cual ocurre a pH entre 10-11.

En este caso en concreto, la razón de la formación del carbonato cálcico puede ser una conjunción de ambas teorías, aunque hay que tener en cuenta que, en principio, parece existir el agua suficiente para que se forme whewellita puesto que, este mineral ha sido detectado en el talo de *Ochrolechia parella* colonizando el mismo afloramiento. Además, la localización específica del carbonato, en las cercanías de un grano de plagioclasa sódica intensamente particulado (Figura 7), parece indicar que en un momento dado pueden existir las condiciones necesarias para que precipite el carbonato, ya que en la alteración de la plagioclasa se libera sodio a la fase líquida que hace que aumente el pH. Los valores de pH de abrasión dados en la bibliografía para la plagioclasa son cercanos a 11, dependiendo de su contenido en Na. Así pues, aceptamos la posibilidad de que en determinados microsistemas se den las condiciones favorables para que ocurra la cristalización de carbonato cálcico.



**Figura 7:** Mapa de distribución de potasio, sodio y calcio en el talo de *Tephromela atra* en el que se aprecia una acumulación de calcio (como carbonato cálcico).



En cuanto al yeso, éste fue detectado por FT-Raman en el talo de 10 muestras de las 20 analizadas (Prieto *et al.*, 1999b). La existencia de yeso en muestras de granito tomadas en la misma zona fue también detectada por Schiavon (1996), quien atribuyó su formación a la actividad biológica. La presencia de este mineral llama la atención ya que las muestras se recogieron en zonas con escasa contaminación atmosférica y tanto la roca como la atmósfera contenían pequeñas cantidades de sulfato y de calcio. A pesar de ello consideramos que el sulfato procede de la atmósfera, lo que implica que los líquenes presentan una afinidad muy grande por este ión y son capaces de provocar alteraciones mineralógicas, y físicas derivadas de la precipitación de la sal, a partir de concentraciones de sulfato tan pequeñas como  $0.0383 \text{ meq.L}^{-1}$ . El calcio puede proceder únicamente de la roca, lo que implicaría una alteración de la plagioclasa. En algún caso además de yeso se detectó también oxalato cálcico (Prieto *et al.* 2000) lo cual indica que la alteración sobre la plagioclasa es muy agresiva ya que puesto que el oxalato cálcico es menos soluble que el yeso, si el yeso cristaliza es porque en la solución hay una cantidad de calcio mayor que la necesaria para la precipitación del oxalato.

#### **d) Formación de óxidos de Fe**

Los óxidos de Fe detectados mediante estudio de láminas delgadas en muestras de granito colonizadas por líquenes tienen la misma morfología que los descritos por Jones *et al.* (1980), es decir, consisten en una delgada capa de color ocre que recubre parcialmente la superficie rocosa debajo de las hifas y que está mezclada con materia orgánica y aluminosilicatos pobremente ordenados. El hecho de que estos óxidos de hierro no hayan sido detectados por difracción de rayos X se explica precisamente por el escaso grado de cristalización que presentan, el cual se sitúa por debajo de los límites de detección de la técnica.

La precipitación de óxidos de hierro pobremente ordenados, así como la formación de geles de aluminio y sílice, es atribuida por Jones y Wilson (1985) a la acción de los ácidos orgánicos sobre minerales silicatados.

Parece ser que los óxidos de hierro formados por los líquenes se originan a través de la formación de compuestos solubles de Fe, a partir de la descomposición de los silicatos ferruginosos, que al ser oxidados, posiblemente microbiológicamente, precipitan sobre la superficie de la roca o en el interior del talo (Jones y Wilson, 1986)).

Otra posible explicación a la presencia de óxidos de hierro es que éstos procedan de la humboldtina, un oxalato férrico dihidratado cuya formación parece ser muy rápida cuando reacciona el ácido oxálico, excretado por el micobionte, con biotita. Este oxalato es muy inestable y



da lugar a la formación de anhídrido carbónico (gas) y oxidróxidos de hierro (productos amorfos) (Ins. Inv. Cientif. Tropical, 1994).

Entre los óxidos de hierro formados por los líquenes, la ferrihidrita fue notado por Jones et al. (1980) sobre basalto y por Adamo *et al.* (1993) sobre gabro. La ferrihidrita ( $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) es un hidróxido férrico muy pobremente ordenado, no detectable incluso con microscopio electrónico de transmisión (Jones y Wilson, 1986). Robert y Berthelin, 1986) notaron que la presencia de ácidos orgánicos hace que el Fe aparezca en forma amorfa, induciendo la formación de ferrihidrita, la cual evolucionará a productos cristalinos únicamente después de la destrucción de los complejos de Fe, al ser utilizado el ligando orgánico como fuente de carbono y energía por organismos heterótrofos, o después de la mineralización de la célula.

Otro óxido de hierro encontrado en líquenes es la goethita, un oxidróxido de hierro con formula  $\text{FeOOH}$  que fue detectado por Jones *et al.* (1981) asociado al crecimiento de líquenes sobre esquisto, por Ascaso *et al.* (1976) en la interfaz *Rhizocarpon geographicum*-granito, por Galvan *et al.* (1981) en varios líquenes sobre rocas metamórficas y por Gehrmann y Krumbein (1994) en líquenes sobre rocas carbonatadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamo, P.; Marchetiello, A. y Violante, P. (1993) The weathering of mafic rocks by lichens. *Lichenologist* **25**(3), 285-297.
- Ariño, X.; Ortega-Calvo, J.J.; Gomez-Bolea, A. y Saiz-Jimenez, C. (1995) Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cadiz, España): biodeterioration vs. bioprotection. *The Science of the Total Environment* **167**, 353-363.
- Ascaso, C. (1985) Structural aspects of lichens invading their substrata. En: Surface Physiology of Lichens. C. Vicente, D.H. Brown, E. Legaz (eds.). Universidad Complutense, Madrid. 87-113.
- Ascaso, C.; Galvan, J., Ortega, C. (1976) The pedogenic action of *Parmelia conspersa*, *Rhizocarpon geographicum* and *Umbilicaria pustulata*. *Lichenologist* **8**, 151-171.
- Ascaso, C.; Galvan, J., Rodríguez-Pascual, C. (1982) The weathering of calcareous rocks by lichens. *Pedobiologia* **24**, 219-229.
- Ascaso, C., Wierzechos, J. (1994a) Nuevas aplicaciones de las técnicas submicroscópicas en el estudio del biodeterioro producido por talos líquénicos. *Microbiología Sem* **10**, 103-110.

- Ascaso, C., Wierzbos, J. (1994b) Structural aspects of the lichen-rock interface using back-scattered electron imaging. *Botanical Acta* **107** (4), 187-270.
- Ascaso, C., Wierzbos, J. (1996) Study of the weathering processes of granitic micaceous minerals by lichen activity. En: Proceedings of the Workshop Degradation and Conservation of Granitic Rocks in Monuments. M.A. Vicente, J. Delgado-Rodriguez, J. Acevedo (eds.), Santiago de Compostela, España. 411-416
- Bech-Andersen, J. (1987) Oxalic acid production by lichens causing deterioration of natural and artificial stones. En: The Biodeterioration of Constructional Materials, Proceedings of the Summer Meeting of the Biodeterioration Society. L.H.G. Morton (ed.), 9-13.
- Bell, E.; Dowding, P.; Cooper, T.P. (1993) The biodeterioration of granite. En: Granite Weathering and Conservation. E. Bell y T. Cooper (eds.), 28-32.
- Boyle, J.R.; Voigt, G.K.; Sawhney, B.L. (1967). Biotite flakes: alteration by chemical and biological treatment. *Science* **155**, 193-195.
- Chisholm, J.E.; Jones, G.C.; Purvis, O.W. (1987) Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Mineralogical Magazine* **51**, 715-718.
- Del Monte, M.; Sabbioni, C. (1983) Weddellite on limestone in the Vence environment. *Environ. Sci. Technol.* **17**, 518-522.
- Del Monte, M.; Rattazzi, A.; Romao, P.M.S.; Rossi, P. (1996) The role of lichens in the weathering of granitic buildings. En: Proceedings of Workshop on Degradation and Conservation of Granitic Rocks, M.A. Vicente, J. Delgado-Rodriguez, J. Acevedo (eds.), Santiago de Compostela, España. 301-306.
- Dreher, P., Niederbudde, E.A. (1994) Potassium release from micas and characterization of the alteration products. *Clay Minerals* **29**, 77-85.
- Edwards, H.G.M.; Seaward, M.R.D. (1995) FT-Raman spectroscopic studies of lichen-substratum interfaces in biodeterioration studies. *Biodeterioration and Biodegradation* **9**, 199-203.
- Galvan, J.; Rodriguez, C.; Ascaso, C. (1981) The pedogenetic activity of lichens in metamorphic rocks. *Pedobiologia* **21**, 60-73.
- Gehrmann, C.; Krumbein, W.E. (1994) Interactions between epilithic and endolithic lichens and carbonate rocks. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium The Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. V. Fassina, H. Ott, F. Zezza (eds.). Venecia. 311-316.
- Gerloff, G.C.; Fishbeck, K.A. (1969) Quantitative cation requirements of several green and blue-green algae. *J. Phycol.* **5**, 109-114.

- Henderson, M.E.K.; Duff R.B. (1963) The release of metallic and silicate ions from the minerals, rocks and soils by fungal activity. *Journal of Soil Science* **14**, 236-246.
- Inst. Inv. Cientif. Tropical (1994) Informe interno, STEP CT90-110: "Granitix".
- Jaton, C.; Orial, G.; Brunet, A. (1985) Actions des vegetaux sur les materiaux pierreux. En 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Lausanne. 577-586.
- Jones, D.; Wilson, M.J.; Tait, J.M. (1980) Weathering of basalt by *Pertusaria corallina*. *Lichenologist* **12(3)**, 277-289.
- Jones, D.; Wilson, M.J.; McHardy, W.J. (1981) Lichen weathering of rock-forming minerals: application of scanning electron microprobe analysis. *Journal of Microscopy* **124**, 95-104.
- Jones, D.; Wilson, M.J. (1985) Chemical activity of lichens on mineral surfaces- A review. *International Biodeterioration* **21(2)**, 99-104
- Jones, D.; Wilson, M.J. (1986) Biomineralization in crustose lichens. En; Biomineralization in Lower Plants and Animals. Leadbeater & Riding (eds.). Special Volume n° 30: 91-105.
- Mann, S.; Webb, J.; Williams, R.J.P. (eds.) (1989) Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives. VCH. 541 pp.
- Matteini, M.; Moles, A.; Giovannoni, S. (1994) Calcium oxalate as a protective mineral system for wall paintings: methodology and analices. En: Proceedings of the 3<sup>d</sup> International Symposium The Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. V. Fassina, H. Ott, F. Zezza (eds.). Venecia. 155-162.
- Mortland, M.M.; Lawton, K.; Kehara, G. (1956) Alteration of biotite to vermiculite by plant growth. *Journal of Soil Science* **82**, 477-481.
- Nimis, P.L.; Pinna, D.; Salvadori, O. (1992) Licheni e Conservazione dei Monumenti. Cooperative Libreria Universitaria Editrice Bologna. 165 pp.
- Prieto, B. (1997) Biodeterioro de rocas graníticas. Contribución de los líquenes al deterioro del Patrimonio Monumental construido. Servicio de Publicacións e Intercambio científico da Universidade de Santiago de Compostela (Ed.), 307 pp.
- Prieto, B.; Rivas, T.; Silva B.; Carballal, R.; Lopez de Silanes, M.E. (1994) Colonization by lichens of granite dolmens in Galicia (NW Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation* **34(1)**, 47-60.
- Prieto Lamas, B.; Rivas Brea, M.T.; Silva Hermo, B.M. (1995) Colonization by lichens of granite churches in Galicia (Northwest Spain). *The Science of the Total Environment* **167**, 343-351.
- Prieto, B.; Silva, B.; Rivas, T.; Wierzbos, J.; Ascaso, C. (1997) Mineralogical transformation and neoformation in granite caused by the lichens *Tephromela atra* y *Ochrolechia parella*. *International Biodeterioration and Biodegradation* **40(2-4)**, 191-199



- Prieto, B.; Seaward, M.R.D.; Edwards, H.G.M., Rivas, T.; Silva B. (1999a) Biodeterioration of granite monuments by *Ochrolechia parella* (L.) Mass: An FT Raman spectroscopic study. *Biospectroscopy* **5**, 53-59.
- Prieto, B.; Seaward, M.R.D.; Edwards, H.G.M.; Rivas, T.; Silva, B. (1999b) An Fourier transform-Raman spectroscopic study of gypsum neoformation by lichens growing on granitic rocks. *Spectrochimica Acta Part A* **55**, 211-217
- Prieto, B.; Rivas, T.; Silva, B. (1999c) Environmental factors affecting the distribution of lichens on granitic monuments. *The Lichenologist* **31**(3), 291-305.
- Prieto, B.; Edwards, H.G.M.; Seaward, M.R.D. (2000) A Fourier transform-Raman spectroscopic study of lichen strategies on granite monuments. *Geomicrobiology Journal* **15**, 55-60.
- Purvis, O.W. (1984) The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia. *Lichenologist* **16**(2), 197-204.
- Purvis, O.W.; Elix, J.A.; Broomhead, J.A.; Jones, G.C. (1987) The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist* **19**(2), 193-203.
- Rivas, T. (1997) Mecanismos de alteración de las rocas graníticas utilizadas en la construcción de edificios antiguos en Galicia. Servicio de Publicacións e Intercambio científico da Universidade de Santiago de Compostela (Ed.), 366 pp.
- Robert, M.; Berthelin, J. (1986) Role of biological and biochemical factor in soil mineral weathering. En: Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. P.M. Huang and H. Schinitzer (eds.). Soil Science Society of America. Cap. 12: 453-495.
- Romao, P.M.S.; Rattazzi, A. (1996) Biodeterioration on megalithic monuments. Study of lichens' colonization on Tapadao and Zambujeiro dolmens (Southern Portugal). *International Biodeterioration and Biodegradation* **37**(1-9), 23-25
- Salvadori, O.; Zitelli, A. (1981) Monohydrate and dihydrate calcium oxalate in living lichen incrustations biodeteriorating marble columns of the Basilica of Santa Maria Assunta on the island of Torcello (Vence). En: The Conservation of Stone II. R. Rossi-Manaresi (ed.). Bologna. 379-387
- Salvadori, O.; Lazzarini L. (1991). Lichen deterioration on stones of Aquileian monuments (Italy). *Botanika Chronika* **10**, 961-968.
- Schiavon, N. (1996) Soiling of urban granite 1: microfabrics and mineralogical aspects. En: M.A. Vicente, J. Delgado-Rodriguez, J. Acevedo (Eds.), Degradation and Conservation of Granitic Rocks in Monuments. European Commission, Brussels. 307-312.

- Seaward, M.R.D.; Giacobini, C. (1988) Lichen-induced biodeterioration of Italian monuments, frescoes and other archaeological materials. *Studia Geobotanica* **8**, 3-11.
- Silva, B.; Prieto, B.; Rivas, T.; Sánchez-Biezma, M.J.; Paz, G. (1997) Rapid biological colonization of a granitic building by lichens. *International Biodeterioration and Biodegradation* **40(2-4)**, 263-267.
- Silva, B.; Rivas, T.; Prieto, B. (1999) Effects of lichens on the geochemical weathering of granitic rocks. *Chemosphere* **39(2)**, 379-388.
- Syers, J.K.; Iskandar, I.K. (1973) Pedogenetic significance of lichens. En *The Lichens*, V. Ahmadjian & H. Hale (eds.), Academic Press, London. Cap. 7: 225-248.
- Taboada, T. (1992) Procesos de meteorización de rocas graníticas de Galicia bajo diferentes ambientes edafoclimáticos. Ph.D. Thesis, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Vicente, M.A.; Razzaghe, M.; Robert, M. (1977) Formation of aluminium hydroxy vermiculite (intergrade) and smectite from mica under acidic conditions. *Clay Minerals* **12**, 101-112.
- Wadsten, T.; Moberg, R. (1985). Calcium oxalate hydrates on the surface of lichens. *Lichenologist* **17(3)**, 239-245.
- Wierzbos, J.; Ascaso, C. (1994) Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface. *Journal of Microscopy* **175**, 54-59.
- Wierzbos, J.; Ascaso, C. (1996) Morphological and chemical features of bioweathered granitic biotite induced by lichen activity. *Clays and Clay Minerals* **44(5)**, 652-657.
- Wierzbos, J.; Ascaso, C. (1998) Mineralogical transformation of bioweathered granitic biotite, studied by HRTEM: evidence for a new pathway in lichen activity. *Clays and Clay Minerals* **46(4)**, 446-452.
- Wilson, M.J. (1995) Interactions between lichens and rocks; a review. *Cryptogamic Botany* **5**, 299-305.
- Wilson, M.J.; Jones, D.; Russel, J.D. (1980) Glushinskite, a naturally occurring magnesium oxalate. *Mineralogical Magazine* **43**, 837-840.
- Wilson, M.J.; Jones, D.; McHardy, W.J. (1981) The weathering of serpentinite by *Lecanora atra*. *Lichenologist* **13(2)**, 167-176.
- Wilson, M.J.; Jones, D. (1983) Lichen weathering of minerals: implications for pedogenesis. En: *Residual Deposits: Surface Related Weathering Processes and Materials*. Wilson R.C.L. (ed.), Geological Society of London, special publication 11: 5-12.
- Wilson, M.J.; Jones, D. (1984) The occurrence and significance of manganese oxalate in *Pertusaria corallina* (Lichenes). *Pedobiologica* **26**, 373-379.





# ECOLOGIA MICROBIANA EN AMBIENTES HIPOGEOS: UTILIZACIÓN DE FUENTES DE CARBONO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

M.A. González-del Valle, L. Laiz, A. Ortiz-Martínez y C. Sáiz-Jiménez

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC,  
Apartado 1052, 41080 Sevilla, España  
e-mail: saiz@irnase.csic.es*

## RESUMEN

En los últimos años se ha dedicado especial atención a los problemas de biodeterioro derivados del crecimiento de microorganismos en ambientes hipogeos. Una de las características de este tipo de ambientes es su baja temperatura, más o menos constante, que no llegan a superar los 20°C. Este hecho plantea un problema metodológico, pues los aislamientos de bacterias suelen llevarse a cabo a una temperatura de 28°C, diferente de las habituales en ambientes hipogeos. Cabe esperar que la temperatura óptima de aislamiento se encuentre en el rango de temperatura del hábitat estudiado. En este trabajo, se ha abordado el problema metodológico, determinando las temperaturas de crecimiento óptimo y los perfiles metabólicos a distintas temperaturas de cultivo, de una serie de bacterias aisladas a distintas temperaturas de cuevas con pinturas rupestres, situadas en la cornisa Cantábrica (norte de España).

**Palabras clave:** Bacterias, cuevas, pinturas rupestres, temperatura de crecimiento, Biolog.

## INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipogeos se caracterizan por tener temperaturas relativamente bajas y constantes a lo largo del año, así como una elevada humedad relativa, condiciones distintas a las existentes en la superficie (Laiz *et al.*, 1999; 2000). En las últimas décadas, este tipo de ambientes, del que forman parte las cuevas con pinturas rupestres, necrópolis y catacumbas, han sufrido el efecto del turismo de masas. Un sistema de visitas indiscriminadas modifica el microclima, debido al aumento de temperatura y CO<sub>2</sub> producido por los visitantes. A ello se suman los problemas generados por los sistemas de iluminación artificial, que permiten la colonización de microorganismos fotótrofos (Bruno y Albertano, 1999; Albertano *et al.*, 2000). Una adecuada gestión del patrimonio cultural tiende a reducir los efectos antropogénicos

mediante el control de visitas, de forma que no alteren significativamente el microclima.

El estudio del efecto de la temperatura sobre la utilización de fuentes de carbono por parte de microorganismos de ambientes hipogeos es uno de los aspectos de la ecología microbiana que interesa tanto al microbiólogo como al gestor de un bien cultural, ya que permite aumentar el conocimiento sobre la capacidad de adaptación de los microorganismos a este tipo de ecosistemas y su comportamiento metabólico. Ello incide particularmente en los aspectos de conservación de pinturas rupestres, murales y frescos (Rölleke *et al.*, 1996; Hoyos *et al.*, 1998; Cañaveras *et al.*, 1999).

## El sistema Biolog

Para realizar este estudio se ha empleado el sistema Biolog, inicialmente desarrollado para la identificación rápida de bacterias patógenas relacionadas con la microbiología clínica. Sin embargo, este sistema también se mostró como una herramienta adecuada para otro tipo de aplicaciones de interés en ecología microbiana.

El sistema Biolog se basa en una microplaca con 96 pocillos, que contienen 95 fuentes de carbono diferentes y un pocillo blanco (A1) que únicamente contiene agua. Los tipos de fuentes de carbono presentes en las microplacas son: carbohidratos, ácidos carboxílicos, alcoholes, compuestos fosforilados, aminoácidos, compuestos aromáticos, compuestos bromados, aminas, amidas, ésteres y polímeros. A su vez, en todos los pocillos se encuentra un indicador de la actividad redox, violeta de tetrazolio, incoloro, que pasa de forma irreversible a formazan, de color púrpura. Este proceso se produce al llevarse a cabo la oxidación de los sustratos que dan lugar a la aparición de NADH que dona sus electrones a la cadena respiratoria. Las fuentes de carbono y el indicador, se encuentran deshidratados, en la microplaca, rehidratándose al inocular la suspensión de bacterias. La utilización de la fuente de carbono da lugar a la aparición del color púrpura.

La existencia de 95 fuentes de carbono supone que se pueden crear  $2^{95}$  patrones posibles, o lo que es lo mismo aproximadamente  $4 \times 10^{28}$  combinaciones, lo que es más que suficiente para poder ser utilizado como perfil de identificación de bacterias. El estudio de los resultados se hace mediante el software proporcionado por el fabricante, o aplicando métodos estadísticos como análisis de componentes principales (PCA), Manova, Anova, etc.



## **Tipos de microplacas**

Fundamentalmente existen dos tipos, las microplacas de identificación de microorganismos, y las microplacas para usos especiales.

En el primer grupo, las microplacas de identificación, se encuentran las microplacas GN2 (bacterias Gram-negativas), GP2 (bacterias Gram-positivas), AN (bacterias anaerobias), YT (levaduras) y FF (hongos filamentosos). Los tres primeros tipos y las nuevas FF, poseen 95 fuentes de carbono, algunas de ellas específicas, que junto a la base de datos que ofrece el fabricante permiten la identificación del microorganismo. Las microplacas YT, están configuradas para la realización de 94 tests de oxidación y asimilación de levaduras. De este modo las tres primeras filas de la microplaca poseen las fuentes de carbono y el indicador colorimétrico (violeta de tetrazolio) para los tests de oxidación, las 5 filas restantes poseen las fuentes de carbono para los tests de asimilación (la última fila posee dos fuentes de carbono por pocillo), que son cuantificados por turbidometría. En este caso el fabricante también incluye una base de datos para la identificación de las especies.

En el segundo grupo, de microplacas para usos especiales, existen las SFN2, SFP2 (ambas destinadas a la caracterización metabólica de hongos y actinomicetos, cuyo crecimiento se inhibe con el indicador colorimétrico), Ecoplacas (empleadas en el estudio de poblaciones), ES (específica para *Escherichia coli* y *Salmonella* sp.) y MT2 (para aplicaciones desarrolladas por el investigador). Las SFN2 y SFP2 poseen la misma composición que las GN2 y GP2, respectivamente, pero sin el indicador colorimétrico, ya que éste no es reducido por actinomicetos y hongos. En este caso se determina el crecimiento mediante la medida de la turbidez. Las Ecoplacas contienen 31 fuentes de carbono, por triplicado, por ello, son adecuadas para el estudio de comunidades bacterianas, puesto que permiten la creación de una "huella dactilar funcional", característica de cada población. Las microplacas MT2 tienen la misma composición en nutrientes y composición química que las GN2, pero no incluyen las fuentes de carbono, lo que permite que sea el usuario quien ensaye los compuestos de su interés. En ninguno de estos casos el fabricante aporta una base de datos, ya que no es aplicable.

### ***Limitaciones del sistema***

Fundamentalmente son cuatro:

1. Densidad inicial del inóculo, ya que el desarrollo de color es directamente proporcional a la densidad del inóculo, así las



densidades bajas pueden producir falsos negativos y viceversa, densidades altas pueden producir falsos positivos, incluso el pocillo blanco dar reacción. En principio se puede evitar el problema de la baja densidad del inoculo con mayores periodos de incubación, pero como se verá este es otro factor limitante.

2. Tiempo de incubación, el desarrollo de color también es directamente proporcional al tiempo de incubación, así según aumenta este, aumenta el color. Este factor y el anterior, a su vez, interfieren con el siguiente.
3. Tasa de crecimiento de los microorganismos, esta se ve afectada por el inoculo y la cepa bacteriana, lo que puede conducir a largos periodos de incubación.
4. Medio de cultivo de las placas y requerimientos específicos, este es un factor relacionado con las necesidades de una determinada cepa bacteriana. Como se ha indicado, las placas del Biolog contienen el medio deshidratado, y en determinadas ocasiones este puede resultar inadecuado, de tal modo que impida el desarrollo de la bacteria, lo cual provoca la aparición de menos resultados positivos. Este factor limitante en principio podría solventarse inoculando con una alta densidad de bacterias, en estado exponencial de crecimiento, para poder ver la actividad fisiológica, sin perder de vista la primera limitación indicada.

Todas estas limitaciones están directamente relacionadas con la manipulación de los microorganismos y con la propia naturaleza de estos. Sin embargo, estas limitaciones se pueden aprovechar para el desarrollo de nuevas aplicaciones.

## **Uso de las distintas microplacas y perspectivas de nuevas aplicaciones**

El sistema Biolog posee un gran rango de posibilidades, permitiendo un elevado número de estudios, tales como la identificación de microorganismos, caracterización de estados fisiológicos de una población, distinguir poblaciones entre sí, realizar tests de toxicidad o de degradación de determinados compuestos, etc.

La relativa simplicidad del método permite combinar técnicas de microbiología clásica con métodos automatizados, como la combinación del sistema Biolog y el MPN (most probable number) (Gamo y Shoji, 1999) lo que permite estimar el número de usuarios de una misma fuente de carbono dentro de una determinada población. El desarrollo de esta técnica se basa en las limitaciones propias del sistema.

Una de las aplicaciones más frecuentes ha sido su aplicación al estudio de poblaciones microbianas en suelos (Garland, 1996; Heuer y

Smalla, 1997), ya que determinando los patrones bioquímicos de las poblaciones presentes se puede detectar la posible relación de las bacterias con las rizosferas de determinadas plantas.

Otra aplicación interesante es el estudio de la diversidad funcional (Zak *et al.*, 1994; Insam *et al.*, 1996). Este tipo de estudio permite determinar la capacidad de colonización de una población de microorganismos, o los posibles cambios de población, que se van a producir al cambiar las condiciones del entorno.

El ensayo de la degradación de compuestos tóxicos es una de las aplicaciones de las microplacas MT2 de Biolog, y permiten ensayar hasta con 95 tóxicos diferentes o con 95 poblaciones diferentes para un mismo tóxico (Gorden *et al.*, 1993; Strong-Gunderson y Palumbo, 1994; Lee *et al.*, 1995).

También es de destacar que el patrón bioquímico que surge del Biolog en la caracterización de poblaciones bacterianas puede combinarse con métodos moleculares, como ARDRA y DGGE (Smalla *et al.*, 1998), o fenotípicos (Verschuere *et al.*, 1997).

En definitiva, el sistema Biolog es muy versátil, ya que permite un gran número de aplicaciones en estudios microbiológicos. Además se perfila como una herramienta adecuada para el estudio de los biofilms, y en el caso que nos ocupa, como un sistema para el estudio de las actividades metabólicas de las poblaciones presentes en monumentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Procedencia de las cepas estudiadas

Las bacterias empleadas procedían de los muestreos realizados en las cuevas de Llonín y Tito Bustillo, en Asturias, y La Garma, en Cantabria. Todas ellas se encuentran en la cornisa Cantábrica (norte de España) y poseen importantes muestras de arte rupestre. Las dos primeras son cuevas que han sufrido un importante impacto antropogénico, mientras que la tercera se considera como una cueva "virgen". La primera, Llonín, fue empleada durante 13 años (1957-1970) para la elaboración y maduración del queso de Cabrales. La segunda, Tito Bustillo, es una cueva visitable de marzo a septiembre con un régimen de visitas de 400 personas/día, divididas en grupos de 25 personas con un tiempo de visita de 40-50 minutos. Esta cueva sufre inundaciones periódicas producidas por la crecida de un río subterráneo. La tercera cueva, La Garma, fue descubierta en noviembre de 1995, y sólo ha sido abierta para los estudios arqueológicos. De hecho hasta el muestreo, realizado en octubre de 1998, sólo había sido



visitada por 64 personas, con un tiempo total de permanencia en la cueva de 45 horas.

## Identificación

Las identificaciones se realizaron mediante el análisis de los ácidos grasos metilados de las bacterias, mediante el sistema MIDI, según los protocolos de cultivo en medio sólido y las especificaciones instrumentales recomendadas por el fabricante (Microbial Identification System, Inc., Delaware, USA). La base de datos empleada fue Sherlock Standard Aerobe Database. Para los casos en los que el índice de similitud obtenido en el sistema MIDI era inferior al 0,7 se empleó el sistema Biolog (Biolog, Inc. Hayward, California, USA), utilizándose las microplacas GN2 y GP2, y la base de datos GN2 y GP2 versión 4.0.

Las cepas bacterianas estudiadas se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1**

Identificación, procedencia y temperatura de aislamiento de las bacterias estudiadas.

Bacteria	Identificación	T° aislamiento	Cueva
LL515	<i>Arthrobacter viscosus</i>	13°C	Llonín
TBS3	<i>Bacillus halodurans</i>	28°C	Tito Bustillo
TBS21	<i>Bacillus megaterium</i>	20°C	Tito Bustillo
M613	<i>Bacillus</i> sp.	13°C	La Garma
TBS91	<i>Kocuria</i> sp.	5°C	Tito Bustillo
M612	<i>Pseudomonas putida</i>	13°C	La Garma
M637	<i>Pseudomonas</i> sp.	5°C	La Garma
LL519	<i>Sporosarcina ureae</i>	13°C	Llonín

## Microplacas y procedimiento de incubación

Las microplacas empleadas en el estudio a diferentes temperaturas fueron GN2 y Ecoplacas. Para todas las cepas estudiadas se utilizaron las placas GN2 y Ecoplacas por duplicado. Las temperaturas de incubación de las microplacas fueron 28°C, 13°C y 5°C (esta última solamente en las cepas aisladas a 5°C). Se eligieron estas temperaturas de incubación debido a que 28°C es la temperatura habitual de incubación en el laboratorio, 13°C es la temperatura de las



cuevas, y 5°C fue seleccionada para identificar posibles cepas psicrófilas.

## Obtención y análisis de los resultados

Se tomaron medidas a las 24 y 48 horas de incubación, excepto en las placas incubadas a 5°C que fueron medidas a las 72 y 96 horas. La utilización de las fuentes de carbono se determinó mediante la aparición de color en los pocillos debido a la reducción del violeta de tetrazolio, realizándose la medida a 590 nm en un lector E-Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA). Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se corrigieron mediante la sustracción del valor de DO obtenido en el pocillo blanco (A1) del resto de los pocillos, obteniéndose de este modo la DO neta de cada pocillo (Verschuere *et al.*, 1997). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando Análisis de Componentes Principales (PCA) a los resultados mediante el programa Statistica (Kernel release 5.5, StatSoft, Inc, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las tres cuevas estudiadas se aislaron un gran número de bacterias que se incubaron a distintas temperaturas: 5, 13, 20 y 28°C. De esta serie se seleccionaron 8 cepas bacterianas aisladas a diferentes temperaturas. Dos procedían de la cueva de Llonín; *Arthrobacter viscosus* y *Sporosarcina ureae*. Tres procedían de Tito Bustillo; *Kocuria* sp., *Bacillus megaterium* y *Bacillus halodurans*. Por último, tres procedían de La Garma; *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

Para determinar si se producía un uso diferencial de fuentes de carbono de las distintas cepas en función de la temperatura de cultivo, se utilizaron las microplacas GN2 y Ecoplacas de Biolog.

Las placas GN2 poseen 95 fuentes de carbono diferentes, de las cuales 28 son carbohidratos, 24 ácidos carboxílicos, 20 aminoácidos, 2 ésteres, 5 polímeros, 2 alcoholes, 3 amidas, 3 compuestos fosforilados, 4 compuestos aromáticos, 1 compuesto bromado y 3 aminas (Garland y Mills, 1991). Las Ecoplacas son una versión modificada y reducida de la anterior, de modo que poseen sólo 31 fuentes de carbono, de las que 26 coinciden con las placas GN2 y las 5 restantes son distintas. Las 31 fuentes se pueden agrupar como en el caso anterior, según su naturaleza, en 8 carbohidratos (7 comunes con GN2), 7 ácidos carboxílicos (6 comunes con GN2), 6 aminoácidos (5 comunes con

GN2), 4 polímeros (todos comunes con GN2), 2 compuestos fosforilados (comunes con GN2), 2 compuestos aromáticos (nuevos) y 2 aminas (comunes con GN2). Como se puede apreciar, la diferencia entre ambos tipos de placas no es sólo el número sino también el tipo de fuentes. Así, en las Ecoplacas desaparecen algunas familias de compuestos. Además hay que tener en cuenta que el peso de cada fuente en el conjunto de la microplaca es mayor en las Ecoplacas, ya que en estas cada fuente supone el 3,22% del total, mientras que en las GN2 es el 1,05%. Por ello, no se debe comparar los resultados de ambos tipos de microplacas, sino que deben analizarse por separado. Evidentemente debe existir una coincidencia en los resultados obtenidos.

En las Tablas 2 y 3 se representa los grupos de fuentes de carbono presentes en los dos tipos de microplacas ensayadas y la utilización de estas por parte de las 8 bacterias seleccionadas. Se observa que a 13°C la mayoría de las bacterias utilizan un mayor número de fuentes de carbono que cuando se incuban a 28°C en microplacas GN2. Las dos bacterias aisladas a 5°C mostraron que a esa misma temperatura utilizaban un menor número de fuentes de carbono que a 13 y 28°C. Los aislados a 13°C mostraron, en todos los casos, la utilización de un elevado número de fuentes de carbono a esa temperatura. Cabe destacar que *A. viscosus* y *S. ureae* solo fueron capaces de utilizar unas pocas fuentes de carbono a 28°C. *Bacillus megaterium*, aislada a 20°C, también tuvo un comportamiento similar, mostrando una mayor eficiencia a 13°C que a 28°C.

Los resultados obtenidos en las Ecoplacas son similares a los de las placas GN2, aunque con algunas divergencias, como en el caso de *B. halodurans*, que en las Ecoplacas utilizó un mayor número de fuentes de carbono a 13°C. Sin embargo, hay que destacar que el porcentaje de fuentes empleado en las diferentes temperaturas, en este caso, es muy similar, 58% de fuentes empleadas a 13°C y 42% a 28°C, en las Ecoplacas, frente a 76% a 13°C y 92% a 28°C en las microplacas GN2, en ambos casos la diferencia entre temperaturas es de un 16%.

En general se produce una mayor utilización de fuentes de carbono a 13°C. Sin embargo, cabría preguntarse si esta capacidad de uso va acompañada de una eficiencia similar, para determinar si las bacterias aisladas a estas temperaturas están adaptadas a ellas, es decir si son psicrófilas o toleran las bajas temperaturas siendo otra su óptimo de crecimiento. Se define la eficiencia de uso, como la DO a 590 nm obtenida al utilizar una determinada fuente de carbono, mediante la transformación del violeta de tetrazolio en formazan. En la Tabla 4 se muestra un cuadro resumen de las eficiencias de uso, determinadas en función de la DO media total de la microplaca. Así se

**Tabla 2:** Uso de las fuentes de carbono por las 8 bacterias seleccionadas, incubadas en microplacas GN2

	Fuentes carbono Biolog	<i>Arthrobacter viscosus</i>		<i>Bacillus</i> sp		<i>Bacillus halodurans</i>		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Kocuria</i> sp			<i>Pseudomonas</i> sp			<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Sporosarcina ureae</i>	
		13°	28°	13°	28°	13°	28°	13°	28°	5°	13°	28°	5°	13°	28°	13°	28°	13°	28°
Carbohidratos	28	27	2	28	14	22	24	28	23	6	27	20	14	23	19	23	23	28	2
Ácidos carboxílicos	24	21	1	21	1	18	20	22	14	8	18	13	22	24	23	14	9	21	0
Amino ácidos	20	20	0	20	5	16	20	20	16	2	15	11	16	20	20	10	3	20	0
Esteres	2	2	1	2	1	1	2	1	1	0	2	1	2	2	2	2	2	2	0
Polimeros	5	4	2	4	5	4	5	5	3	1	5	5	2	5	4	4	3	5	1
Alcoholes	2	1	0	2	1	2	2	2	1	0	1	0	1	2	1	1	1	2	0
Amidas	3	3	0	3	1	2	3	3	3	0	2	2	2	2	3	3	3	3	0
Compuestos fosforilados	3	3	0	3	0	3	3	3	0	0	2	0	1	1	1	1	1	3	0
Compuestos aromáticos	4	4	0	4	4	3	4	4	4	2	3	0	3	3	3	3	3	4	0
Compuestos bromados	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
Aminas	3	3	0	3	0	3	3	3	0	1	3	1	1	3	2	0	0	2	0
Total de fuentes de carbono empleadas	95	89	6	91	33	75	87	92	66	21	78	54	65	86	79	62	49	90	3



**Tabla 3:** Uso de las fuentes de carbono por las 8 bacterias seleccionadas, incubadas en Ecoplacas

	Fuentes carbono Biolog	Arthrobacter Viscosus		Bacillus sp		Bacillus halodurans		Bacillus megaterium		Kocuria sp			Pseudomonas sp			Pseudomonas putida		Sporosarcina ureae	
		13°	28°	13°	28°	13°	28°	13°	28°	5°	13°	28°	5°	13°	28°	13°	28°	13°	28°
Carbohidratos	8	7	3	7	4	7	5	7	6	5	7	8	8	7	8	7	7	8	5
Ácidos carboxílicos	2	4	0	4	1	3	1	7	6	2	4	6	7	7	7	6	4	7	1
Amino ácidos	6	5	0	2	5	5	4	6	5	6	5	6	6	6	6	0	2	5	1
Polimeros	4	3	0	3	3	3	3	4	2	0	4	4	4	4	4	3	2	4	4
Compuestos fosforilados	2	2	0	2	0	0	0	2	1	4	2	1	2	2	1	1	0	0	0
Compuestos aromáticos	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	0	0	0
Aminas	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	2	1	0	1	2	1
Total de fuentes de carbono empleadas	31	22	3	19	13	18	13	27	20	18	23	27	31	30	28	19	18	28	12

ve que las bacterias aisladas a 13°C son más eficientes utilizando las fuentes de carbono a esta temperatura, excepto *Arthrobacter viscosus* en las microplacas GN2, donde es ligeramente menos eficiente que en las Ecoplacas. Las bacterias aisladas a 5°C son mucho más eficientes a 28°C, mientras que la bacteria aislada a 28°C es más eficiente a su temperatura de aislamiento, y la aislada a 20°C lo es a 13°C.

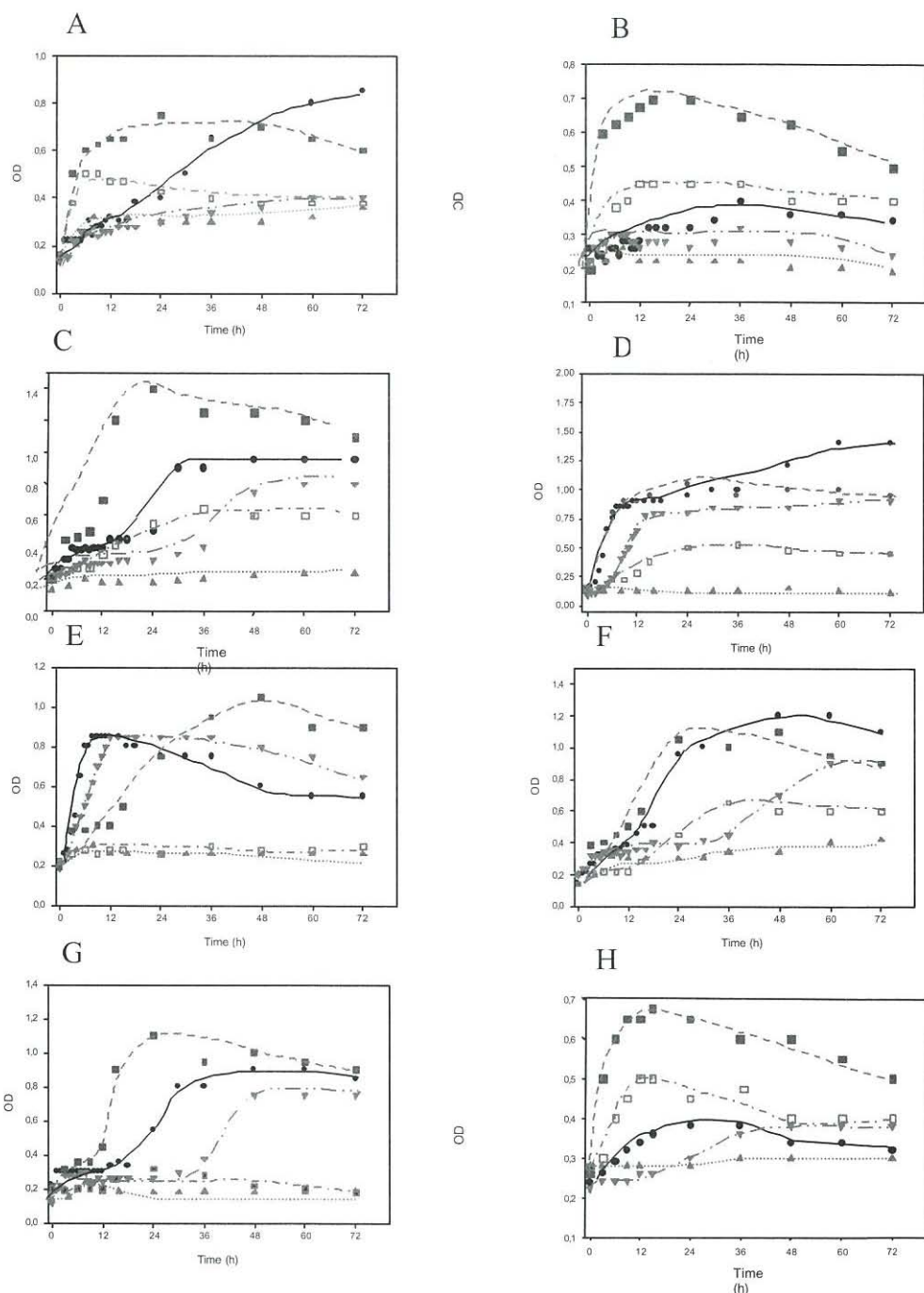
**Tabla 4**  
Eficiencia de uso de las fuentes de carbono

	GN2			Ecoplaca		
	5°C	13°C	28°C	5°C	13°C	28°C
<b>Arthrobacter viscosus</b>	-	++	+++	-	+++	+
<i>Bacillus</i> sp.	-	++	+	-	++	+
<i>Bacillus halodurans</i>	-	+	++	-	+	++
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+++	++	-	++	+
<i>Kocuria</i> sp.	+	++	+++	+	++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+	+++	++	+	+++
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+++	++	-	+++	++
<i>Sporosarcina ureae</i>	-	+++	+	-	+++	+

- no determinado; + poco eficiente; ++ eficiente; +++ muy eficiente

Se puede establecer un criterio de eficiencia/uso de fuentes de carbono, de tal modo que las bacterias aisladas a 13°C y 20°C utilizan más fuentes y lo hacen con más eficacia a 13°C. En las bacterias aisladas a 28°C y 5°C no se obtiene esta relación de un modo claro, aunque también es cierto que el número de fuentes de carbono empleadas a las distintas temperaturas es muy similar, lo que hace que se aprecien más los efectos de la variabilidad de la población bacteriana.

Según lo visto hasta ahora, cabría esperar que la mayor parte de las bacterias tuviesen su óptimo de crecimiento cerca de los 13°C, sin embargo, la obtención de las curvas de crecimiento de todas las bacterias en el rango de 5-45°C, indicó que los óptimos de crecimiento no coinciden con esta temperatura, como muestra la Figura 1. En efecto, todas las bacterias tienen el óptimo de crecimiento entre 28° y 38°C. Definir la temperatura óptima de crecimiento es complejo en algunos casos, como sucede en el caso de *Bacillus* sp., aunque también tenemos casos claros como el de *Arthrobacter viscosus*, con un



**Figura 1:** Curva de crecimiento a 5°C (s), 13°C (t), 28°C (l), 38°C (n) y 45°C (•) de A) *Kocuria* sp (aislada a 5°C), B) *Bacillus megaterium*. (aislada a 20°C), C) *Pseudomonas putida* (aislada a 13°C), D), *Bacillus halodurans* (aislada a 28°C), E), *Bacillus* sp. (aislada a 13°C), F), *Pseudomonas* sp. (aislada a 5°C) and G), *Sporosarcina ureae* (aislada a 13°C), H), *Arthrobacter viscosus* (aislada a 13°C)



crecimiento óptimo a 38°C. Para determinar la temperatura de crecimiento óptimo, se midió el crecimiento a las 24 horas de cultivo, que es el momento en el que se realiza la medida en el sistema Biolog, tomándose de este modo las mayores pendientes de crecimiento (Tabla 5).

**Tabla 5**

Crecimiento de las bacterias a distintas temperaturas. Determinación del crecimiento de las bacterias a las 24 horas, a distintas temperaturas de incubación

	Temperatura de cultivo				
	5°C	13°C	28°C	38°C	45°C
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	++	+++	+
<i>Kocuria sp.</i>	+	+	++	+++	++
<i>Arthrobacter viscosus</i>	+/-	++	++	+++	++
<i>Sporosarcina ureae</i>	-	+	++	+++	+/-
<i>Pseudomonas putida</i>	+/-	+	++	+++	+
<i>Bacillus sp.</i>	+/-	++	+++	++	+/-
<i>Bacillus halodurans</i>	-	+	+++	++	+
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	+	+++	++

+++ : Crecimiento óptimo; ++ : Buen crecimiento; + : Crecimiento;

+/- : Crecimiento escaso; - : No Crecimiento

A la vista de los resultados obtenidos, parece que existe una discordancia entre la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de uso de fuentes de carbono por parte de algunas de las bacterias estudiadas. Este hecho puede estar relacionado con la adaptación de las bacterias de ambientes hipogeos a las bajas temperaturas, de modo que para contrarrestar el efecto térmico recurren a la diversificación del uso de fuentes de carbono y a ser más eficaces utilizándolas.

Como conclusión, se observa que la temperatura es un factor importante en la actividad metabólica de las cepas estudiadas, ya que modifica la eficiencia y el uso de fuentes de carbono por parte de la célula. Sin embargo, a la hora de realizar aislamientos, la temperatura no parece un factor esencial, ya que en todos los casos estudiados se ha visto que todas crecen mejor entre 28 y 38°C, a pesar de su procedencia. La aplicación de análisis estadístico multifactorial a los resultados (análisis de componentes principales), viene a confirmar lo dicho hasta ahora, no aportando nueva información, en este caso.

A su vez, se ha observado que no se producen grandes diferencias en la información obtenida en las Ecoplacas y las placas GN2. Quizás la principal diferencia sea el efecto de la variabilidad metabólica sobre los resultados obtenidos, de tal modo que las Ecoplacas son más sensibles a la variabilidad, hecho que se aprecia en el análisis estadístico. En las Ecoplacas el efecto de la temperatura es más uniforme, apreciándose menos diferencias que en las microplacas GN2. De todos modos, estas diferencias no son significativas en la mayoría de los casos. Así se puede afirmar que el uso de los dos tipos de microplacas es indiferente siempre que se tenga en cuenta el efecto de la variabilidad sobre las Ecoplacas.

A modo de conclusión final, se puede afirmar que la mejor temperatura de aislamiento para microorganismos procedentes de ambientes hipogeos es de 28°C, aunque posteriormente es conveniente en otro tipo de experimentos, como por ejemplo, el estudio del efecto de la actividad metabólica de estos microorganismos sobre pinturas rupestres, capacidad de colonización de nuevas bacterias en ambientes hipogeos, etc., recurrir a las temperaturas habituales en su entorno natural, ya que es el único modo de explotar toda la potencialidad del microorganismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albertano, P., Bruno, L., D'Ottavi, D., Moscone, D., Palleschi, G. (2000) Effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. *J. Appl. Phycol.* **12**, 379-384.
- Bruno, L., Albertano, P. (1999) Photoacclimation of sciaphilous ephilitic cyanobacteria isolated from Roman hypogea. *Algol. Stud.* **94**, 89-103.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., González, I., Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, northern Spain). *Geomicrobiol. J.* **16**, 9-25.
- Gamo, M., Shoji, T. (1999) A method of profiling microbial communities based on a Most-Probable-Number assay that uses Biolog Plates and multiple sole carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4419-4424.
- Garland, J.L., Mills A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351-2359.
- Garland, J.L. (1996) Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil. Biol. Biochem.* **28**, 223-230.

- Gorden, R.W., Hazen, T.C., Fliermans, C.B. (1993) Rapid screening for bacteria capable of degrading toxic organic compounds. *J. Microbiol. Meth.* **18**, 339-347.
- Heuer, H., Smalla, K. (1997) Evaluation of community-level catabolic profiling using Biolog GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J. Microbiol. Meth.* **30**, 49-61.
- Hoyos M., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E. (1998) Microclimatic characterization of karstic cave: human impact on microenvironmental parameters of prehistoric rock art cave (Candamo cave, northern Spain) *Environ. Geol.* **33**, 231-242.
- Insam, H., Amor, K., Renner, M., Crepaz, C. (1996) Changes in Functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microb. Ecol.* **31**, 77-87.
- Laiz, L., Groth, I., González, I., Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J. Microbiol. Meth.* **36**, 129-138.
- Laiz, L., Groth, I., Schmann, P., Zezza, F., Felske, A., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C. (2000) Microbiology of the stalactites from grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Int. Microbiol.* **3**, 25-30.
- Lee, C., Rusell, N.J., White, G.F. (1995) Rapid screening for bacterial phenotypes capable of biodegrading anionic surfactants: development and validation of a microtitre plate method. *Microbiology* **141**, 2801-2810.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Warnner, C., Warnner, G., Lubitz, W. (1996) Identification of bacteria in the biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W., Forney, L. (1998) Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1220-1225.
- Strong-Gunderson, J.M., Palumbo, A.V. (1994) Alternative method for rapidly screening microbial isolates for their potential to degrade volatile contaminants. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 361-366.
- Verschuere, L., Fievez, V., Van Vooren, L., Verstraete, W. (1997) The contribution of individual populations to the Biolog Pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**, 353-362.
- Zak, J.C., Willing, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil. Biol. Biochem.* **26**, 1101-1108.



# ESTADO DEL ARTE EN EL DETERIORO DE MONUMENTOS Y MORTEROS ANTIGUOS ORGÁNICOS PARA SU RESTAURACIÓN

Elia Alonso<sup>1</sup> y Lorenzo Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Facultad de Ingeniería Civil, UMSNH, México,  
e-mail: ealonso@zeus.umich.mx*

<sup>2</sup>*Centro de Ciencias Físicas, UNAM, México,  
e-mail: lorenzo@ce.fisica.unam.mx*

## RESUMEN

No encontramos en la literatura especializada datos específicos sobre el deterioro de las ignimbritas, rocas ígneas extrusivas regionales con las que se construyeron los mas de mil monumentos arquitectónicos en el Centro Histórico de Morelia. Los factores que influyen en el deterioro de las rocas que sí han sido estudiadas como mármol, caliza, arenisca, granito básicamente pueden clasificarse en antropogénicos como la quema de combustibles fósiles y formación de pátinas reactivas. La capilaridad, la eflorescencia, la recristalización que provocan grietas que se propagan a lo largo de planos de falla provocando exfoliación y pérdida de masa. El deterioro afecta la resistencia mecánica y la estética, y a su vez provoca pérdidas económicas. Se estudia la posibilidad de proteger los elementos verticales de los monumentos con morteros de cal de base orgánica (sangre, leche, mucílago, huevo, algodón, lana de cordero, grasa).

**Palabras clave:** ignimbritas, rocas ígneas extrusivas, deterioro, daño antropogénico, morteros antiguos de base orgánica.

## ANTECEDENTES

Morelia, es la capital de Michoacán, fue fundada en 1541 por el Virrey Don Antonio de Mendoza (Tavera Montiel, 1999 y Ramírez Romero, 1994). Morelia, fue declarada como Herencia de la Humanidad por la UNESCO, dependencia de la ONU. A la fecha se encuentran totalmente inventariados los 1.113 monumentos arquitectónicos coloniales, erigidos en el centro histórico. Los monumentos fueron construidos con ignimbritas de los bancos de cantera de los alrededores de la Ciudad (Tavera Alfaro, 1995).

Morelia se encuentra localizada en el noroeste de Michoacán y éste último a su vez está localizado en la costa del océano Pacífico. Su situación geográfica es justo en el cruce de la Sierra Madre Occidental (la mayor cadena montañosa del país), el Eje Neovolcánico o Cinturón Volcánico Mexicano, las Placas Tectónicas de Cocos y de Rivera. La orografía descrita es producto de la continua actividad volcánica y al mismo tiempo es precursora de las rocas ígneas extrusivas que son las que nos ocupan.

Las rocas ígneas son las rocas jóvenes del planeta (Asimov, 1996), son productos volcánicos. Las rocas ígneas pueden ser de tipo extrusivo o intrusivo. Son rocas ígneas extrusivas si fueron eyectadas en eventos volcánicos y son intrusivas si no existieron las condiciones termodinámicas de presión y temperatura en las cámaras magmáticas y permanecieron dentro de la corteza terrestre.

Después de que las rocas ígneas fueron extruídas a la litósfera, debido al meteorismo presentaron disgregación mecánica y fueron trasladadas por agentes eólicos, pluviales, fluviales; nuevamente se sedimentaron por gravedad y se consolidaron, dando lugar a las rocas sedimentarias cuya composición mineralógica suele ser como la de la roca madre. Cuando las rocas ígneas están expuestas a metamorfismo por el intemperismo regional, suelen presentar migración de iones y cambios mineralógicos que dan lugar a nuevas especies mineralógicas que no están contenidas en la roca madre, son las rocas metamórficas.

Las ignimbritas son rocas ígneas extrusivas, como son productos volcánicos, son también conocidas como flujos piroclásticos o lluvia de fuego, especialmente por nuestros ancestros que describían los eventos volcánicos como lluvia de fuego. Se les conoce como tobas, pues si el magma tiene una gran cantidad de agua, las explosiones violentas pulverizan el magma y ese polvo fino al sedimentarse en la superficie y consolidarse da lugar a las tobas o cenizas consolidadas. El nombre de riolitas b toman de su composición química, las tres composiciones geológicas básicas son riolitas, dacitas y andesitas. Las riolitas contienen en promedio un 70% o más de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y son rocas de tipo ácido.

El nombre de ignimbritas es un término acuñado en la literatura inglesa e introducido en la literatura geológica por Marshall (Marshall, 1935) y da idea no sólo de la composición en función de su contenido de sílice sino también por la forma y extensión de la colada en el momento de la eyección volcánica. El término no sólo indica toba soldada, también el origen genético de su formación a partir de flujos o cenizas piroclásticos.

Las ignimbritas son productos volcánicos comunes siendo encontrados en todos los asentamientos volcánico tectónicos (Leet y Judson, 2000). Riolita, dacita y andesita son sus composiciones



usuales. El modelado teórico muestra que el cambio de actividad pliniana a formación de ignimbritas varía en función del radio de abertura, velocidad de los gases y contenido de  $H_2O$  (Wilson, 1976; Sparks y Wilson, 1976).

Pueden ser reconocidos tres procesos: soldamiento, cristalización de la fase vapor y devitrificación. Soldamiento es sintetizar juntos los fragmentos de pumicita caliente y los shards (bigotes o esquirlas) de cristal bajo carga compactacional. Los controles más importantes son (a) la viscosidad del vidrio que depende de la temperatura y composición y (b) la carga litostática que depende del espesor del depósito.

El contenido de líticos en un depósito también afecta el desarrollo del soldamiento. Los estudios experimentales indican que el proceso de soldamiento inicia entre 600°C y 750°C para composiciones riolíticas, dependiendo de la carga de presión y el contenido de  $H_2O$  en el vidrio. Característicamente, cuando el soldamiento termina, se producen tres zonas: densamente soldadas, parcialmente soldadas y no soldadas. Algunos autores (Smith, 1960b) clasificaron las ignimbritas que muestran soldamiento simple como unidades de enfriamiento simples y Riehle (1973) encontró que estas variaciones pueden ser predichas del análisis teórico del enfriamiento de un estrato, emplazado con temperatura uniforme.

La temperatura de emplazamiento de las ignimbritas es por lo tanto muy variable, Smith (1960a) consideraba que los procesos dentro la columna eruptiva debían ser los responsables y Sparks (1976) explicó esto por el modelo de colapso de la columna eruptiva.

El tiempo que se toma producir el soldamiento ha sido estimado, de manera teórica por Riehle (1973) y Kono y Osima (1971).

Cristalización de la fase vapor: resulta de la percolación de gases calientes a través de las ignimbritas durante el enfriamiento. Los principales productos de la cristalización de la fase vapor son la tridimita, cristobalita y feldespatos alcalinos, que ocurren cuando los gases cargados de sílice se infiltran en la matriz y las cavidades pumíceas formando cementante o reduciendo el espacio de poros. La devitrificación envuelve la cristalización sub-sólidos de gases metaestables. Los productos principales son cristobalita y feldespatos alcalinos. Existen muchos procesos que pueden producir alteración, uno es lixiviación del agua adyacente y los estudios muestran que el gas metaestable es fácilmente lixiviado y el Sodio, Potasio y Silicio son frecuentemente removidos (Cas y Wright, 1988).

Cuando Morelia fue nombrada Patrimonio de la Humanidad y aceptó que preservará los monumentos, una de las opciones viables para la preservación y conservación era la de recubrir los elementos verticales como muros y fachadas con morteros. Inicialmente los



monumentos del Centro estuvieron recubiertos con morteros de cal y arena, en proporción en volumen 1:3 (Silva Ruelas, 1990), pero a principio de la década de los 60, al Ing. Manuel Rodríguez (2001), Supervisor de Obras Públicas del Municipio, le fue encomendada la tarea de “descubrir” el edificio que hoy ocupa la Secretaría de Salud, lo que desató una fiebre por retirar los morteros de los edificios.

Tradicionalmente cuando se realizaba alguna construcción de tipo civil, se invitaba a los familiares y amigos a que colaboraran en las actividades que requerían fuerza bruta, tal hecho obligaba a reuniones sociales donde debía ofrecerse comida a los invitados: entonces del hecho de darle uso a los desperdicios de la comida, nace el uso de materiales orgánicos en los morteros, tales como la, la sangre de bovino, lana de cordero, cola, algodón, fibras de lechuguilla, copra, clara de huevo, huevo completo, mucílago de cactáceas, savia y pétalos de flores como la nochebuena (Sickels, 1999) y estos aditivos para los morteros fueron clasificados según el efecto que producían en las mezclas dado que nos encontramos en una zona de alta sismicidad y los edificios históricos se han revisado para saber si son sismorresistentes (Meli Piralla, 1998), todos ellos mezclados con arena volcánica natural del Banco de Joyitas ampliamente estudiada en la región (Martínez Molina, 2001), banco situado a 18 Km de la ciudad, así como arena de río.

Las ignimbritas sanas o extraídas de los bancos de cantera han sido caracterizadas física, química, mecánica y petrológicamente para su uso como material de construcción de nueva creación (Alonso, 1996) así como ha sido estudiada la matriz en rocas deterioradas (Alonso et al., 1998), los Reglamentos de Construcción Vigentes en el Estado de Michoacán y el Distrito Federal, hablan de resistencias mecánicas a la compresión del orden de 100 Kg/cm<sup>2</sup> para su uso como material de mampostería (R. de Mich., 1999 y RDF, 1996).

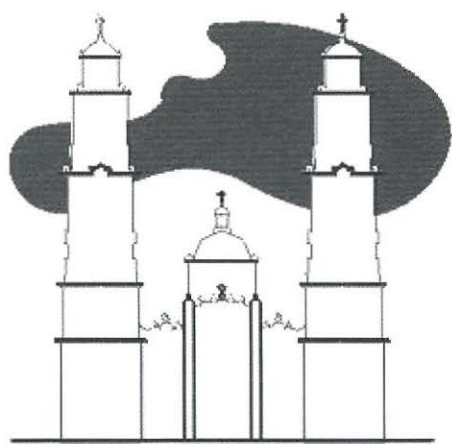
La mayoría de las publicaciones en la literatura especializada acerca del deterioro de monumentos corresponden en su mayoría a rocas como el granito, el mármol, la caliza y la arenisca y no existen trabajos publicados sobre el deterioro de ignimbritas. En el deterioro de monumentos históricos de granito, se concluye que no hay notable alteración mineralógica en la mayoría de los minerales, pero se encuentra un efecto de disolución que se desarrolla a lo largo de los planos de los folios de las micas (Robert et al., 1992). El granito ha sido estudiado relativamente poco comparado con las construcciones de rocas calcáreas, por la gran resistencia del granito a la alteración. El granito no tiene grupos alcalinos para neutralizar la incipiente depositación ácida. (Sweevers et al., 1995)

Los estándares para realizar determinaciones de calidad físicas y mecánicas en las rocas sanas están contenidos en la American Society

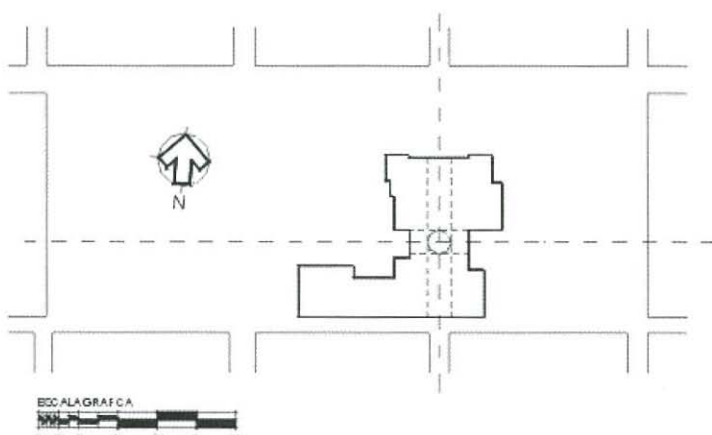
for Testing and Materiales (ASTM, 2000). Las rocas deterioradas suelen ser analizadas en los contados casos en que son removidas para ser reemplazadas o consolidadas, según lo indicado por la UNESCO (Colloque International Alteration et Protection des Monuments en Pierre, 1978), lo mismo ocurre con los morteros antiguos de albañilería que han sido estudiados y descritos en diversos trabajos (Sherwood, 1999; Charola y Henriques, 1999; Thompson y Groot, 1999; Fontaine et al., 1999) pero para los cuales tampoco existen estándares internacionales.

En algunos casos ha sido posible el empleo de técnicas no destructivas (Qasrawi, 2000; ASTM, 1993; British Standard 1986) para calificar la resistencia mecánica en muros de edificios que muestran signos de deterioro.

La catedral de Morelia es el monumento elegido para calificar su deterioro, su construcción duró aproximadamente 84 años, terminándose en 1744. Sus dimensiones son 77.00m x 30.00m de superficie mientras que sus torres tienen una altura aproximada de 66.80 metros sobre el nivel de piso terminado y sólo son superadas, en nuestro país, por las torres de la Catedral de Puebla con 70.00 m de altura (Silva, 1984), Figuras 1 y 2.



FACHADA PRINCIPAL DE LA CATEDRAL  
ESCALA 1 : 500



**Figuras 1 y 2:** Esquema de la Catedral de Morelia. Arriba se presenta la fachada y abajo la planta arquitectónica.

Se han realizado muchos estudios acerca de las condiciones ambientales en el deterioro de los monumentos europeos. Mayormente, la atención está dirigida a los efectos del deterioro inducido antropogénicamente (Leysen et al., 1989; Fassima, 1978). El deterioro antropogénico es el inducido por el hombre, en este caso por el uso de vehículos que emplean combustibles fósiles y su uso se ha generalizado a partir de la segunda mitad del siglo XX. (Coursimault et al., 1995), se ha observado que la topografía local y la orientación de los bloques de roca tienen también un gran efecto (O'Brien et al., 1995).

Los modelos automotores modelo 1995 están emitiendo 75% menos CO, 70% menos HC y 65% menos NO que los modelos anteriores (Bishop et al., 1997) y desde el período 1991-1994, México ha instituido muchas nuevas iniciativas para reducir las emisiones ligeras incluyendo un agresivo programa para renovar el parque vehicular de los carros de alquiler (Diario Oficial de la Federación, 1993), a partir de 1999 el Instituto Mexicano del Petróleo inició un programa de investigación tendiente a minimizar en lo posible las emisiones de contaminantes que han disminuido de entre 600 y 800 ppm de azufre (Schifter, 2000). La Ciudad de Morelia no es una ciudad con gran número de industrias; la mayor parte de los contaminantes provienen de los vehículos automotores y del servicio público de transporte y ocurre en otros sitios turísticos como lo mostró el Programa Nacional Italiano de Energía para 1989, que informó que ~50% del polvo es debido al sector transporte. (Realini et al., 1995)



En sitios donde existen cavernas en exposición es posible probar hipótesis acerca de la contribución de las más importantes fuentes al problema del manchado en las paredes de las cavernas. La composición mineralógica de los depósitos de polvo en las cavernas es consistente con el polvo siendo una combinación de 10-20% de polvo local, 9-17% producto del deterioro del techo de la caverna o pared y un promedio de 53% de polvo de la combustión de los vehículos de los caminos cercanos (que pueden variar del 27 al 92%). (Salmon et al., 1995).

Los análisis realizados por cromatografía de iones, confirman que el azufre está presente principalmente en la forma de yeso, el azufre no sulfatado (1.7%) puede ser atribuido a la presencia residual del  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y compuestos orgánicos azufrosos. Los resultados indican que el Cnc es el elemento principal debido a las depositaciones antropogénicas en aerosol y tiene una posible correlación con el yeso. Puede sugerirse que S, C, Br, Pb y Zn son elementos de origen antropogénico. En resumen S y C están asociados con la emisión atmosférica de fuentes de combustible (plantas eléctricas, sistemas de calefacción domésticos y máquinas de diesel), Pb y Br son trazas típicas de la combustión de gasolina y el Zn está relacionado con las emisiones de incineradores. (Sabbioni, 1995) Los patrones espaciales de emisiones muestran que Estados Unidos, Rusia y China eran los principales emisores de azufre (casi el 50% del total mundial) en 1990, con China dominando por el 1900 a 1.1 Gton /anuales (Lefohn et al., 1999).

Los procesos de deterioro y transformación de los diferentes componentes del material son debidos a contaminantes sulfúricos, metales pesados, alquenos de la combustión de petróleo, residuos animales, hongos, etc., todos ellos con las condiciones ambientales. El principal proceso de alteración ocurre en la superficie del material (Del Monte et al., 1984; Baedecker et al., 1992; Sáiz-Jiménez, 1993; Pérez-Rodríguez et al., 1994).

De los constituyentes producidos por la quema de combustibles fósiles,  $\text{NO}_x$  y  $\text{SO}_2$  son los más potentes en el deterioro de las rocas. Durante los periodos secos, ambos se acumulan como materia en partículas sobre la superficie de las rocas y son activadas por periodos subsecuentes de humedad. Disueltos en precipitación, descienden como soluciones ácidas (Lal Gauri y Holdren Jr, 1981), el más abundante de los compuestos del nitrógeno en ambiente de aire es el  $\text{NO}_x$ . Sus efectos adversos en rocas calizas y su sinergismo con otros contaminantes, como el  $\text{O}_3$ , han sido estudiados (Haneef et al., 1993). La presencia de nitritos, como siempre, indica que en cada caso las rocas reaccionan, al menos parcialmente, con los productos de la siguiente reacción  $2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{HNO}_2$ . (Lee y Schwartz,

1981) El  $\text{NO}_2$  y las partículas suspendidas tampoco permanecen invariables y se incrementan (Cobourn et al., 1993).

La sulfuración (sulfatación) con el desarrollo de la cristalización del yeso autigénico bajo la superficie del material, afecta las rocas carbonatadas (caliza, mármol, arenisca con cemento carbonáceo, etc.) expuestas a la contaminación atmosférica. Este mecanismo ha sido experimentalmente reproducido, revelando el importante rol que juega el  $\text{SO}_2$  incrementado por la presencia de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{O}_3$  (Haneef et al., 1992) y la alta humedad relativa (Spiker et al., 1992). La investigación indica que los granos de mármol están estructuralmente debilitados por una conversión química de masa del mármol a cristales de yeso (Cheng y Castillo, 1984).

Las cenizas volátiles emitidas por la quema de combustibles pesados es altamente reactiva, conllevando transformaciones químicas y morfológicas que aumentan el crecimiento cristalino, especialmente del yeso (Ausset et al., 1999), pero ha sido difícil mostrar tendencias debido a las amplias variaciones observadas en la composición de agua de lluvia (Colin et al., 1990).

Los mecanismos por los cuales los contaminantes del aire dañan los materiales pueden clasificarse como: 1) Abrasión, 2) Depositación y remoción, 3) Ataque químico directo, 4) Ataque químico indirecto, 5) Corrosión electromecánica.

Se toma más tiempo que los contaminantes aéreos solo dañen los materiales. Una cantidad de otras condiciones ambientales fuertemente influyen la relación a la cual los contaminantes dañan los materiales: 1) Humedad, 2) Temperatura, 3) Congelamiento y deshielo (Yocom, 1979).

Los ciclos subsecuentes de disolución y cristalización, junto a la hidratación y deshidratación de las sales, susceptibles a la cristalización con un número diferente de moléculas de agua, causando esfuerzos en la roca que dan por resultado una disgregación y desmoronamiento de la superficie expuesta y la formación de hojas de exfoliación (Amoroso y Fassima, 1983). Los cristales crecidos en los poros de la roca son inversamente proporcionales a la densidad de la misma (Jacobs et al., 1995), sin requerirse pruebas directas destructivas, los macroporos como las fracturas, los hoyos de lombriz (bioturbaciones) y los canales cubiertos de 1 mm y más largos pueden ser fácilmente distinguibles (Griffiths y Roberts, 1999). La gravedad específica tridimensional de los suelos más la macroporosidad llena de aire pueden ser calculadas con secciones transversales, mientras se infiltran las soluciones colorantes para mostrar la continuidad de los poros (Peyton et al., 1992).

Cuando los cristales crecen dentro de los poros y su tamaño es tal que no caben dentro de él, lo fracturan y producen microgrietas que se propagan en forma tridimensional. En otras palabras, un material poroso



inicialmente isotrópico puede convertirse en un material anisotrópico si las microgrietas inducidas por esfuerzos están generalmente orientadas en algunas direcciones preferenciales (Shao, 1998) Este crecimiento de la grieta dependiente del tiempo, comúnmente llamado crecimiento sub-crítico, es debido al fenómeno de esfuerzos de corrosión (Atkinson y Meredith, 1987), las microgrietas mencionadas se propagan con mayor rapidez en materiales con presencia de agua (Lajtai et al., 1987).

Pueden existir grandes diferencias en la exposición a la contaminación en dos fachadas del mismo edificio (Dolske, 1995). La distribución de estas áreas susceptibles no sólo depende de la dirección y velocidad del viento, temperatura y humedad durante y después de las precipitaciones sino también en las estructuras de las fachadas y no están suficientemente estudiadas. (Lammel y Metzgi, 1997).

La erosión eólica, también llamada 'corrasión', ocurre cuando partículas abrasivas se impactan con gran energía en una roca durante largos períodos causando un extenso daño micromecánico que eventualmente redundará en efectos macroscópicos (Camuffo, 1995). En el análisis y diseño arquitectónico nunca debe perderse de vista la exposición de las fachadas del edificio a los vientos dominantes (Riley et al., 1998), el no hacerlo ocasiona que en un mismo edificio se presenten zonas de alto, medio y nulo deterioro (Felden, 1982). Los principales contaminantes asociados con la precipitación ácida son partículas de  $\text{SO}_4^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , y  $\text{HNO}_3$  y  $\text{SO}_2$  gaseosos.

Las areniscas que contienen cuarzo predominantemente autigénico sobrecrecido en enlaces podrían ser relativa y químicamente resistente a ambos: ácidos y bases (Petuskey et al., 1995). La premisa de este estudio fue el porcentaje de deterioro de la albañilería de arenisca si fuera influida por absorción de contaminantes externos, que dependería principalmente de la durabilidad química de las fases enlazadas (Cooke y Gibbs, 1994), el deterioro superficial de los monumentos muestra un gradiente de la superficie hacia el interior de los bloques de roca, respecto a la presencia de Azufre (Ausset et al., 1996).

La velocidad de depositación de  $\text{SO}_2$  para superficies húmedas de mármol es un orden de magnitud más grande que la depositación en una superficie seca de otra manera bajo circunstancias comparables. (Spiker et al., 1992). El uso de isótopos de azufre para elucidar el origen del azufre ambiental ha sido muy importante en el estudio del deterioro de areniscas (rocas sedimentarias calizas) de monumentos (Torfs et al., 1997). Ha sido demostrado que el mecanismo de reacción para la sulfatación del  $\text{CaCO}_3$ , no cambia entre  $200$  y  $2 \times 10^9 \mu\text{g m}^{-3} \text{SO}_2$ . Aún usando altas concentraciones de  $\text{SO}_2$  como  $6 \times 10^8 \mu\text{g m}^{-3} \text{SO}_2$ , que son altas comparadas con las concentraciones que atacan a las rocas. (Skoulkidis, 1993). El conocimiento geoquímico ambiental de los



metales traza en la superficie de la tierra ha sido incrementado por los numerosos y bien controlados experimentos de laboratorio (Carrol et al., 1998).

Rimstidt et al. (1994) encontró que el Fe (III) acelera la disolución de esfalerita y galena en soluciones ácidas. La catálisis microbiana es otro proceso importante; se espera que sea mínima en este sistema porque la oxidación sulfídica de la bacteria no prospera arriba de pH 4 (Nordstrom, 1982).

El deterioro de los edificios se debe, en menor medida a los llamados bioaereosoles, aerosoles, sales marinas y suelos volátiles (Indoor Pollution News, 1994). Los bioaereosoles incluyen partículas ambientales de bacterias, virus, hongos, esporas, pólenes y fragmentos de plantas e insectos, etc. (Poruthoor et al., 1998). El informe de un panel intergubernamental en cambio climático reconfirmó la habilidad de los aerosoles de afectar el clima por cambios en el balance radioactivo de la atmósfera (Charlson et al., 1992).

El espray marino es la mayor fuente natural de partículas en aerosol en la atmósfera. (Monahan, 1986). Una vez que son formadas, las burbujas se colapsan porqué la energía superficial es transformada en energía cinética entonces un chorro de agua alcanza rápidamente la superficie y se rompe contra el aire en gotas (Zezza y Macrí, 1995).

Los suelos volátiles son partículas que pasan la malla No 200 ASTM y que conforman una pequeña pátina en el globo terrestre (Juárez Badillo y Rico Rodríguez, 1981) y generalmente son minerales producto del metamorfismo que requieren diversas técnicas para su caracterización (Goldstein et al., 1996).

Las arcillas son materiales laminares higroscópicos cuya detección y cuantificación requiere de sofisticación o en su defecto que su presencia sea mayor al 5% del total del material analizado, en caso contrario, su presencia no es detectable (Reardon y Della Valle, 1997). En ciertos casos el agua puede alterar la estructura del material, causando expansión, esfuerzos y fracturas. Cuando la humedad relativa disminuye el agua adsorbida se evapora pero la estructura entre las láminas puede cambiar por la formación de nuevos cristales. La contracción provoca histéresis y a lo largo los ciclos de adsorción-evaporación causan daños irreversibles. (Torraca, 1981). Las arcillas minerales son agentes activos para limpieza de mantos contaminados debido a su singular acomodo atómico y su espacio interlaminar (Xu, et al., 1998).

Métodos elementales de análisis como la Fluorescencia de Rx y la Cromatografía de Iones no pueden diferenciar los cationes (Ca, Mg, Fe, Al, Na, K) del caolín, montmorillonita u otros minerales traza (Solebello, 1999). La técnica de Fluorescencia de Energía Dispersiva de Rayos X, ha sido muy valiosa para evaluar suelos puesto que es una técnica

rápida y fácil (Goldstein et al., 1996), pero debido a las marcadas diferencias entre los suelos, generalizar acerca de la velocidad y extensión de la secuestación o invasión de los mismos no es todavía posible. (Chung y Alexander, 1998). Es razonable asumir que las mayores concentraciones iónicas ocurren durante las primeras lluvias de mayo y después de periodos secos (Saylor et al., 1992). Para soportar que el  $\text{SO}_2$  y el  $\text{NO}_x$  son importantes precursores de  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_x$  y  $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_2$ , para el periodo de 1991-1993. El sulfato fue el más abundante ión en todas las muestras de agua de lluvia, seguido de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ . (Báez et al., 1997).

Se ha encontrado que el mármol pentélico, la caliza portland y la arenisca baumberger no son debilitables por el  $\text{NO}_2$ , mármol y caliza exhiben relativamente baja vulnerabilidad al  $\text{NO}_2$  y esto no varía significativamente con la baja humedad relativa (Kirkitsos y Sikiotis, 1996).

Cuando se analizan los procesos de biodeterioro en una escala urbana, los dos parámetros ambientales prominentes son primero el bioclima y segundo el porcentaje de contaminación (Caneva et al., 1995). El agua de lluvia sube por capilaridad a las rocas de los elementos verticales de los edificios históricos apreciándose como manchones oscuros (Leith et al., 1996).

Los materiales hidratados presentan dificultad para su observación microscópica electrónica, la habilidad de distinguir entre las diferentes formas de minerales, ambos con EELS (Electron Energy Loss Spectrometry/Espectrometría de pérdida de energía de electrones/EPEE) y SAED (Selected Area Electron Diffraction/ Área Seleccionada para Difracción de Electrones/ ASDE) será benéfica para estudios de materiales hidratados. La identificación mineral es una de los mejores caminos para verificar actividades de microorganismos en la corrosión (Pope et al., 2000), una técnica analítica que puede ser usada en una célula ambiental es la difracción electrónica de área seleccionada (Kohyama, 1978).

La precipitación, como siempre, tiene propiedades únicas de socavación y limpieza, que la hacen un empleado indicador de niveles de contaminación ambiental (Parungo et al., 1990). El calor influye en la cinética del deterioro y debe ser cuantificado en casos de cambios de temperaturas extremas (Jauregui, 1997).

El deterioro ambiental en los edificios expuestos puede apreciarse de manera óptica por las pátinas o costras que se forman en su superficie expuesta. Una gran captación de material particulado ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ , C, etc.) (Aragón Piña, 1999), se observa en las superficies intemperizadas (Rodríguez Navarro y Sebastian, 1995).

En particular, las varias interacciones material-medio ambiente que tienen lugar están caracterizadas por (a) superficies "lavadas"



desintegradas, donde los productos fueron eliminados por disolución, (b) pátinas amarillo oxidadas ricas en Fe y Cu, (c) costras negras firmemente unidas y en contacto con agua producto de la percolación, donde los depósitos amorfos de la calcita recristalizada son ricos en S, Si, Fe y partículas carbonáceas, (d) depósitos negros sueltos en las áreas amparadas por el agua, consistentes principalmente de yeso y partículas de ceniza volante, y (e) costras cementicias, cubriendo y corroyendo o picando las superficies horizontales (Moropoulou et al., 1998)

El medio ambiente provee una variedad de compuestos orgánicos -principalmente alquenos, producidos por la combustión de petróleo- los cuales son responsables de las cubiertas negras en el policromado que sirven así mismo como nutrientes para el crecimiento microbiológico (Pérez-Rodríguez et al., 1998). Una fracción de partículas de las costras de intemperismo en los monumentos ha sido también usada como una herramienta para distinguir entre las fuentes de contribución de partículas de aceites y las carbonáceas (Schiavion y Zhou, 1996).

Las rocas empleadas en los monumentos estuvieron en su inmensa mayoría adheridas con morteros de cal que fueron modificados con diversos aditivos. Los mayas, empleaban ya morteros de albañilería de cal tanto con fines estructurales, adhiriendo rocas calizas, como con fines de ornato en los estucos (Villegas et al., 1995). La cultura maya estaba asentada especialmente en la Península de Yucatán lo que los proveyó con abundantes rocas calizas, que son el producto primario para la obtención de cal. (Magaloni et al., 1995), las etnias del centro del país como los Nahuas, ya conocían el proceso de conversión de la roca caliza que contenía carbonato de calcio en óxido de calcio (Barba et al., 1995).

En Europa se empleaban principalmente leche de bovino, sangre de bovino y huevos, en América se emplearon los productos mencionados hasta después de la llegada de los españoles; inicialmente se emplearon mucílago de cactáceas, algodón, lana de cordero (Carbonell De Masy, 1993). A la fecha existen aproximadamente 1300 especies de cactáceas clasificadas, de las cuales nuestro país cuenta con 1089 especies. (Camacho Sánchez, 2001; Aguilar, 1999), los estudios realizados localmente en la elaboración de morteros con leche (Ochoa, 2001), cactáceas y sangre (García, 2001) han mostrado excelente comportamiento mecánico a edades tempranas. En muchos de los casos estudiados se apreció que los morteros mostraron una alta reactividad al medio ambiente provocando sales que deterioraron las rocas que recubrían (Zappia et al., 1994)

La función de los morteros de cal de albañilería no es sólo estética, es de protección superficial en elementos verticales de



mampostería (Sabbioni et al., 1998). Los componentes del Carbón presentes en las pátinas alteradas sobre los morteros pueden tener tres orígenes diferentes: (1) carbonato de calcio derivado casi exclusivamente de los materiales bajo yacentes (Pie, 1987), (2) depositación de partículas ambientales conteniendo carbón elemental y compuestos primarios y secundarios (Turpin y Huntzicker, 1995), (3) descomposición de la roca por agentes biológicos (Sáiz-Jiménez, 1995). Las juntas de mortero y cal en particular son definidas como fuentes potenciales de sales dañinas (O'Brien et al., 1995).

Las partículas de carbón juegan un papel importante como catalizadores de muchas reacciones en la atmósfera, particularmente en la conversión de  $\text{SO}_2$  y óxidos de nitrógeno en ácidos sulfúrico y nítrico. (Zappia et al., 1993) y presentan una trayectoria bien definida antes de depositarse en las fachadas de los edificios (Leuzzi y Monti, 1998).

Los efectos tanto marinos como antropogénicos son determinantes en la formación de pátinas que causan deterioro. Existe una relación entre la composición química de la atmósfera circundante y la composición química de las rocas meteorizadas (Torfs y Van Grieken, 1997), el daño puede cuantificarse en función del "machado" que es un efecto óptico, un oscurecimiento de la superficie que puede ser medida como un cambio en la reflectancia de la luz y está generalmente relacionado a la depositación de materia ambiental en la superficie de los edificios (Newby et al., 1991). Se han reportado dos tipos de pátinas oscuras que se desarrollan en la superficie de los granitos expuesta a atmósferas urbanas contaminantes: (a) costras espesas ricas en yeso y (b) pátinas delgadas ricas en hierro. (Schiavon et al., 1995).

Las sales solubles contenidas en todos los morteros, que se emplean como recubrimientos, son muy similares después de 28 días de curado. El calcio tuvo la mayor concentración en todas las muestras (Duffy et al., 1993). El agua producto de la condensación causa disolución del material de la matriz (Winkler, 1985).

A la fecha en nuestro país los métodos de limpieza superficial de monumentos deben estar aprobados por el INAH. En algunos edificios, como en Mérida ya ha sido empleado con éxito el rayo láser (Lazzarinni et al., 1978; Tenorio, 1997), que volatiliza las pátinas dejando impecables las rocas, pinturas o cubiertas. Algunos métodos no tan empíricos como la baba de nopal o tan sofisticados como el empleo de rayos láser, han sido usados y ampliamente descritos (Clifton, 1986; Lal Gauri, 1986; Boyer, 1986; Jones, 1986).

Dado que los vegetales han sido siempre un importante indicador de la contaminación atmosférica, los líquenes han sido usados para cuantificar trazas de metales pesados y contaminantes en diferentes medios (Wadleigh y Blake, 1999)

La biodisponibilidad de los metales pesados en suelos está principalmente determinada por contenidos de materia orgánica, óxidos de hierro y manganeso, arcillas minerales y pH (Lothenbach et al., 1997). Para relacionar los niveles de contaminación a los rangos de depositación se han hecho ensayos usando especímenes de hierba, crecidos y expuestos bajo condiciones estándar, como bioacumuladores (Cercasov et al., 1998). Para probar la confiabilidad de un método simple de bioacumulador, las depositaciones de contaminantes en la hierba crecida bajo condiciones estándares fueron también investigadas (Cercasov et al., 1996).

El modelado matemático se ha realizado sin éxito total para resolver los problemas geoquímico-ambientales, (Schlink y Herbarth, 1997) los procesos químicos describen el destino de los contaminantes atmosféricos y están matemáticamente representados por un par de juegos de ecuaciones no lineales diferenciales (Mathur et al., 1998). Un componente del modelo para la predicción de las concentraciones del  $\text{SO}_2$  se estudia aplicando la prueba de Fuller (Schlink et al., 1997).

El problema del deterioro en sitios y monumentos histórico arquitectónicos no se reduce a la restauración, habrá que hablar del importe económico. La restauración puede realizarse de manera empírica como se observa con el uso de morteros de cemento hidráulico (Rubio et al., 1998) en las juntas de las pirámides del Sol y la Luna en Teotihuacán. Otros constructores han resuelto el problema estético con el uso de elementos de concreto simulando rocas naturales (Tigue y Hoigard, 2000).

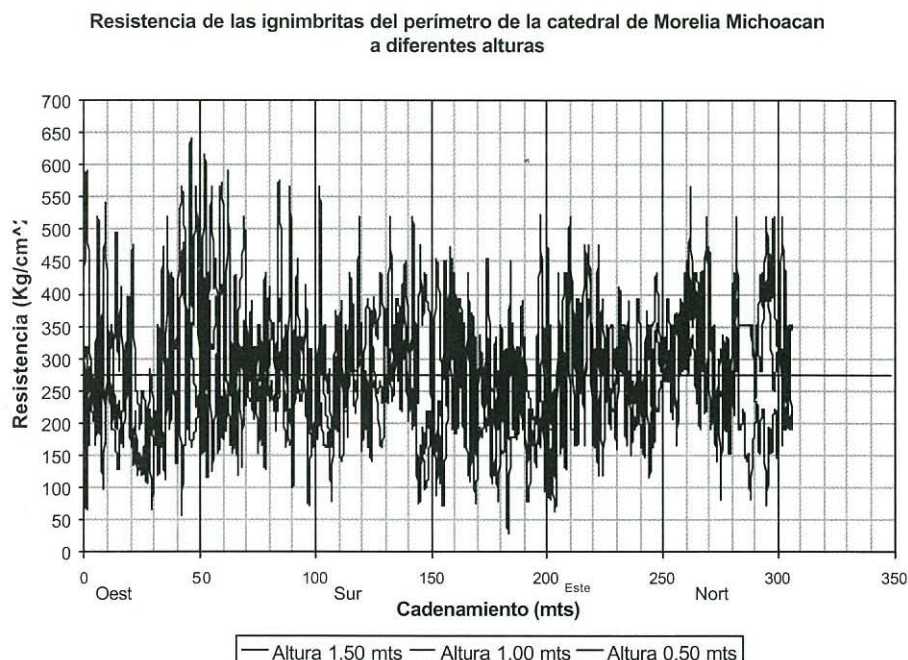
Haciendo el análisis del costo-beneficio regional, se ha cuantificado que las consecuencias financieras del daño son difíciles de estimar (Lareau et al., 1986) El nivel de exposición del material existente a los contaminantes es directamente proporcional a la población (Cowel y Apsimon, 1996)

## METODOLOGÍA

Se caracterizaron las rocas retiradas de la Catedral (Figuras 1 y 2), para observar los diferentes motivos de falla, discriminando si el deterioro puede atribuirse a fenómenos de capilaridad, abrasión mecánica de las partículas sobre la superficie, depositación de partículas antropogénicas que a su vez formarán nuevas especies cristalinas, crecimiento de cristales producto de la eflorescencia, exfoliación de la roca debido a la colocación de la misma en el edificio, es decir si los planos de solidificación de la colada de ignimbrita están colocados de manera paralela o perpendicular a la carga vertical



aplicada, estudiar las pequeñas muestras de mortero obtenidas de las zonas donde fueron adheridas las ignimbritas, se cuantificó la resistencia mecánica de las rocas en el perímetro de la catedral metro a metro en las cuatro fachadas y en cada punto se hicieron tres lecturas a 0.5 m, 1.0 m y 1.5 m con el esclerómetro o martillo de Schmidt, Figura 3.



**Figura 3:** Grafica de la resistencia mecánica de las cuatro fachadas de la Catedral. La dispersión de las medidas es muy alta e ilustra el daño mecánico.

La caracterización de rocas sanas de los bancos de Cointzio (c), Jamaica (J) y Tejocote (T), se realizaron según los estándares ASTM.

La caracterización de las ignimbritas se hizo con microscopía electrónica de barrido (microanálisis EDS y WDS), microscopía óptica de luz transmitida para secciones delgadas petrográficas, pruebas físicas y mecánicas en corazones extraídos de los bloques removidos según los estándares de la ASTM. También se realizaron análisis de Difracción y Fluorescencia de Rayos X, Calcinación para obtención de porcentajes en peso de S y C.

Se verificaron los contenidos de azufre contra los contenidos en las rocas sanas tomadas de las canteras aledañas al municipio y si los contenidos de azufre o partículas antropogénicas están en función de la exposición de las fachadas. Se estudiaron los diferentes morteros de



base orgánica para determinar el de mejor comportamiento mecánico para protección de sitios y monumentos.

Los morteros fueron elaborados según los estándares indicados en la American Society for Testing and Materials para morteros de cemento y cal.

## EXPERIMENTACIÓN

Los resultados indican que las ignimbritas de la catedral presentan un soldamiento alto, en algunos monumentos cuyas fachadas están protegidas de los vientos dominantes se recomienda el aplanado de los muros o elementos verticales con morteros antiguos de base orgánica. En la antigüedad el material de construcción se limitaba a la calcinación de rocas calizas para obtener cal para construcción. La arena empleada es del tipo ígneo extrusivo volcánico natural. Se tomaron muestras representativas de la misma para realizar las pruebas índices, sugeridas por la ASTM y conocer la calidad para el diseño de la mezcla. Las arenas fueron empleadas en proporción 1:2 en peso con respecto a la cal. Los aditivos empleados fueron: leche de ganado bovino, sangre de ganado bovino, lana de cordero y mucílago de cactácea. Se realizó y caracterizó una muestra de mortero como testigo (T), sin aditivo, para comparar los resultados de las pruebas mecánicas.

La leche empleada se empleó sin tratamiento alguno, sin pasteurización ni tamizado, las proporciones de leche empleadas son 75, 50 y 25% (L75, L50 y L 25), con respecto al volumen de leche.

La sangre se obtuvo del sacrificio de ganado bovino, no se enfrió ni centrífugo, tampoco fue sometida a tratamiento alguno, las concentraciones de la sangre fueron del 10, 15 y 20% del volumen total del líquido de amasado (S10, S15 y S20), la función de la sangre en los morteros es la de retardar el fraguado.

La lana de cordero se redujo a tamaños de 2 y 3 cm de longitud manualmente, los porcentajes fueron del 0,1 , 0,2 y 0,3% del peso total de los sólidos del mortero y las mezclas con lana fueron designadas como W1, W2 y W3, respectivamente.

El mucílago de nopal se obtuvo, picando las pencas de la cactácea e hirviéndolas en agua por espacio de una hora. El mucílago (M) hervido por 20 minutos se empleó en dos concentraciones alta y baja: la alta (MA) se obtuvo con 1kg de nopal en 6 litros de agua y la baja (MB) con 0,35 kg de nopal y 6 litros de agua. La cactácea empleada en estos morteros es del género *Opuntia* (Aguilar Becerril, 1999), en el lenguaje coloquial se les llama nopales. El uso del mucílago, de sus almidones, en los morteros es para retener el agua de amasado y favorecer el fraguado.

Los especímenes fueron cubos de 5 cm x 5 cm x 5 cm de arista para las pruebas de esfuerzo de ruptura a la compresión ( $F_c$ ). Los especímenes cúbicos fueron probados hasta la ruptura en la Máquina Universal de Pruebas Tinius Olsen con capacidad de 50 toneladas y aproximaciones al kilogramo. Los cubos se cabecearon con arena sílica.

Las edades de prueba fueron 7, 14, 28, 45 y 60 días de edad. Se probaron a la compresión un promedio de 6 especímenes cúbicos para cada edad y con cada uno de los aditivos, es decir un total de (5 edades de prueba) x (6 cubos para cada edad) x (aditivos para cada mortero = testigo + leche [tres concentraciones] + sangre [tres concentraciones] + mucílago [dos concentraciones] + lana [tres porcentajes] = 12 aditivos), lo que da un total de 360 cubos.

## RESULTADOS

La caracterización mecánica de las rocas sanas está resumida en la Tabla 1.

Los análisis de los contenidos del porcentaje de S, las especies mineralógicas y el resultado de la Fluorescencia de Rx de las rocas sanas y deterioradas, los contienen las Tablas 2, 3 y 4. Las rocas deterioradas están marcadas con las letras BE, BI y SA, que indican: BE, Balaustrado Exterior; BI, Balustrado Interior y SA, San Agustín; cúpula de una iglesia cercana a la catedral pero no con un nivel de exposición tan alto.

Los resultados claramente indican que el daño que presentan las ignimbritas son de tipo antropogénico, mayormente por la quema de combustibles fósiles pues las partículas observadas en las superficies de las rocas estudiadas mostraron en la morfología en MEB depositaciones menores de 20 micras que contenían V y S, típicos productos de la quema de los combustibles. Se observó un fenómeno que se repitió a lo largo de la experimentación y es que hay un gradiente de distribución de azufre en los bloques removidos de la catedral Figura 4, las mayores concentraciones se encontraron en las superficies de las fachadas expuestas y las menores concentraciones al interior de los mismos, como se publicó en el Primer Manual del CYTED, en Sevilla, España en Febrero del 2001 y en el Taller CYTED Morelia, 1999.

**TABLA 1**

Composición química de las ignimbritas consideradas en el presente estudio. SA: San Agustín, BE: Balastrado exterior de la Catedral, BI: Balastrado interior de la Catedral, C es la mina de Cointzio, J es la mina de jamaica, y T es la mina del Tejocote.

	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pérd.	Sum	S
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
SA	68.482	0.387	13.61	3.116	0.026	0.763	1.989	2.922	3.160	0.114	5.06	99.63	0.039
BE	68.74	0.381	13.961	2.891	0.027	0.826	1.191	3.141	3.42	0.079	4.96	100.62	0.409
BI	69.238	0.399	13.971	3.008	0.031	0.751	2.059	3.181	3.407	0.081	4.64	100.77	0.111
C	72.076	0.407	14.124	3.097	0.048	0.224	1.443	3.889	4.367	0.098	0.64	100.41	<0.010
J	76.467	0.199	12.239	1.671	0.034	0.147	0.893	3.444	4.306	0.056	0.54	100.00	<0.001
T	76.675	0.150	12.723	1.222	0.018	0.350	0.705	2.918	4.562	0.030	1.42	100.77	<0.001



**TABLA 2**

Elementos traza presentes en las ignimbritas consideradas en el presente estudio. SA: San Agustín, BE: Balastrado exterior de la Catedral, BI: Balastrado interior de la Catedral, C es la mina de Cointzio, J es la mina de jamaica, y T es la mina del Tejocote.

	<b>Rb</b>	<b>Sr</b>	<b>Ba</b>	<b>Y</b>	<b>Zr</b>	<b>Nb</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Th</b>	<b>Pb</b>
SA	131	240	995	20	262	7	40	11	10	8	48	133	15	18
BE	133	209	858	25	249	7	36	12	9	197	17	69	21	21
BI	135	232	898	25	310	8	38	6	11	28	34	291	20	17
C	147	170	963	21	254	6	36	9	7	3	15	70	19	13
J	157	106	993	16	167	6	17	6	14	11	28	61	16	13
T	168	105	1059	15	147	6	28	<2	9	6	15	33	18	16

**TABLA 3**

Propiedades físicas y mecánicas de las ignimbritas recién extraídas de las minas y normas de construcción en vigor.

Pruebas físicas y mecánicas	Norma	Cointzio	Jamaica	Tejocote
Densidad Aparente, $T/m^3$ ó $gr/cm^3$ ASTM C 99 – 52 (76)	1,50 mín	1,56	1,49	1,63
Porcentaje Absorción Agua ASTM C 97 – 47 (77)	4% máx	25,55	22,25	16,63
Gravedad Específica ASTM C 97 – 52 (56)	2.3 mín	1,44	1,44	1,60
Módulo de Ruptura, $kg/cm^2$ ASTM C 97 – 52 (76)	---	25,04	42,15	51,63
Esf. Rup. Compresión, Edo. Seco $kg/cm^2$ ASTM C 170 – 50 (76)	100 mín	47,08	61,51	73,86
Desgaste Mecánico, Prueba Angeles, % ASTM C 241 – 51 (76)	30% máx	41	48	35
Intemperismo Acelerado, %	10 % máx	30	35	15

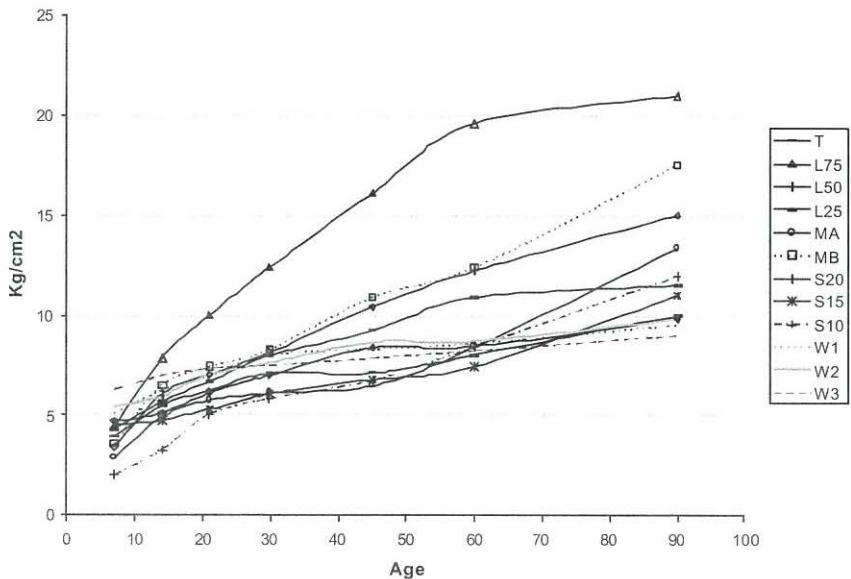
**TABLA 4**

Composición mineralógica de las ignimbritas de monumentos y de las minas consideradas en el presente estudio. SA: San Agustín, BE: Balastrado exterior de la Catedral, BI: Balastrado interior de la Catedral, C es la mina de Cointzio, J es la mina de jamaica, y T es la mina del Tejocote.

M	Minerales, DRX
SA	Plagioclasas (posible andesina), montmorillonita, Caolinita, material no cristalino
BE	Plagioclasas (posible andesina), montmorillonita, Material no cristalino
BI	Plagioclasas (posible andesina), montmorillonita, Material no cristalino
C	Cuarzo, plagioclasas (posiblemente andesina)
J	Cuarzo, plagioclasa (posiblemente andesina)
T	Cuarzo, plagioclasas (posiblemente andesina)



## MORTEROS COMPRESION.



**Figura 4:** Gráfica de la resistencia mecánica de los morteros orgánicos que se han propuesto para recubrir y proteger los monumentos históricos.

En los casos en que los bloques estaban recubiertos con morteros de cal, la superficie de la roca presentó menor deterioro, pero si los morteros tenían espesores mayores de 3,5 cm éstos impedían que las ignimbritas “respiraran” provocando problemas agudos de eflorescencias.

Respecto a los morteros se observó a edades tempranas que los morteros elaborados con leche, sangre y mucílago de nopal presentaron comportamientos mecánicos superiores a los obtenidos por los especímenes de los morteros testigo (sin aditivos), pero a edades tardías el mejor comportamiento lo presentó el mortero elaborado con mucílago de nopal hervido, para todas las sollicitaciones mecánicas, Figura 4. Los morteros reforzados con fibras de origen animal no presentaron incrementos en su resistencia mecánica a la compresión.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la búsqueda bibliográfica se observa que existe nula información sobre el empleo y deterioro de ignimbritas como

material de construcción en sitios y monumentos histórico arquitectónicos.

Se observa en la Figura 4 que los morteros elaborados con mucílago de cactáceas presentan el mejor comportamiento en general, sin embargo se observa que los morteros elaborados con leche de ganado bovino fueron los más elásticos y a edades tardías presentan los mejores comportamientos mecánicos, pero la leche al tener partículas oleosas presenta poca evaporación, lo que no ocurre en los casos del mucílago que básicamente está compuesto de sílice y calcio.

En el caso específico de la sangre puede decirse que su comportamiento es medianamente aceptable a edades tempranas, sin embargo los especímenes que han sido probados a edades tardías han mostrado baja reactividad al medio ambiente circundante y un color verde característico de los óxidos de hierro, es importante mencionar que en algunos casos la mezcla de mortero se elaboró con algunos coágulos para calificar su efecto en las mezclas y cuando fraguaron se hizo evidente que los coágulos dejaron oquedades que funcionaron como concentradores de esfuerzos al realizar las pruebas mecánicas.

Los morteros de cal simple, o muestras testigo, que no tienen alguno de los aditivos mencionados presentaron además de un comportamiento errático los valores más bajos en todas las sollicitaciones mecánicas y en todas las edades de prueba, su uso entonces no se justifica de ninguna manera sin aditivos.

Es de llamar la atención hacia la propuesta de restauración de faltantes de mortero, con los morteros aquí propuestos que han proporcionado los mejores resultados a largo plazo, especialmente la leche, sin embargo a la fecha los más empleados son los morteros con mucílago de cactácea.

**Agradecimientos:** Los autores quieren de una manera especial agradecer a los I.C.: C.S. Camacho, L. García, E. Ochoa y R. Ruíz, por su disposición para las cuantificaciones del comportamiento mecánico de los morteros. Esta investigación ha sido parcialmente financiada por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), los autores también expresan su gratitud a los Ingenieros F. Solorio y T. Alfaro, del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas. Los autores quieren también expresar su agradecimiento a la Empresa Calizas de Michoacán, S.A., y a los Ingenieros S. Murillo y T. Alanís por proveer la Cal empleada en la presente investigación.

Hacemos un reconocimiento al Dr. Héctor Videla por su apoyo con el Programa CYTED, en la Red Preservar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Becerril, G. (1999) Aspectos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos del nopal (*Opuntia SPP*), Tesis Doctoral, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2-7.
- Alonso, E. (1996) Propiedades físicas y mecánicas de ignimbritas del Municipio de Morelia, Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Alonso, E., Bedolla, E., Martínez Gomez, L. (1998) SEM study on the ignimbrites from ancient monuments in Morelia, Michoacan, Mexico. International Conference on Electron Microscopy ICEM 14, Cancun, Mexico. Symposium FF, Vol. III.
- Amoroso, G.G., Fassima, V. (1983) Stone Decay and Conservation, Atmospheric Pollution, Cleaning, Consolidation and Protection. Materials Science Monographs, Number 11, Editorial Elsevier, Amsterdam.
- Annual Book of American Society for Testing and Materials Standards 2000, ASTM, Section Four, Construction, Volume 04.08, Soil and Rock (I): D420-D5779.
- American Society for Testing and Materials (1993) ASTM C805-85, Test for Rebound Number of Hardened Concrete, Phil, USA.
- Aragón, A. (1999) Características Físico-químicas y morfológicas del polvo suspendido en el aire de la Ciudad de San Luis Potosí, Tesis Doctoral, Facultad de Química UNAM, 130-164.
- Asimov, I. (1996) Breve Historia de la Química, Alianza Editorial, Decimoquinta Reimpresión, Madrid, España, 9-13.
- Atkinson, B.K., Meredith, P.G. (1987) The theory of subcritical crack growth with applications to minerals and rocks. Fracture Mechanics of Rock. Academic Press, London, 113-166.
- Ausset, P., Crovisier, J.L., Del Monte, M., Furlan, V., Girardet, F., Hammecker, C., Jeannette, D., Lefèvre, R.A. (1996) Experimental study of limestone and sandstone sulphation in polluted realistic conditions the Lausanne Atmospheric Simulation Chamber (LASC), *Atmospheric Environment* **30(18)**, 3197-3207.
- Ausset, P., Del Monte, M., Lefèvre, R.A. (1999) Embryonic sulphated black crusts on carbonate rocks in atmospheric simulation chamber and in the field: role of carbonaceous fly-ash, *Atmospheric Environment* **33**, 1525-1534.
- Baedecker, P.A., Reddy, M.M., Reimann, K.J., Sciammarella, C.A. (1992) Effects of acidic deposition on the erosion of carbonate stone. Experimental results from the U.S. national acid precipitation assessment program (NAPAP), *Atmospheric Environment* **26-B**, 147-158.



- Baez, A.P., Belmont, R.D., Padilla, H.G. (1997) Chemical Composition of Precipitation at Two Sampling Sites in Mexico: a 7-year Study, *Atmospheric Environment* **31**(6), 915-925.
- Barba, L., Córdova, J.L., Link, K.F., Ortiz, A. (1995) New Studies in the Building Materials of Teotihuacan, México, *Materials Research Society Symposium Proceedings* **352**, 491-496.
- Beloyannis, N., Mirtsou, E. (1995) The Arch of Galerius in Salonica. Problems created by pollution, methodology of intervention, works of conservation. *The Science of the Total Environment* **167**, 181-184.
- Bishop, G.A., Stedman, D.H., de la Garza, J., Davalos, F.J. (1997) On-Road Remote Sensing of Vehicle Emissions in Mexico, *Environmental Science and Technology* **31**, 3505-3510.
- Boyer, D.W. (1986) Masonry Cleaning – The State of the Art, Cleaning Stone and Masonry, *ASTM Special Technical Publication* **935**, 25-51.
- British Standard 1881: Part 202 (1986) Recommendations for Surface Hardness Tests by the Rebound Hammer, BSI, U.K.
- Camacho Sánchez, C.S. (2001) Caracterización de Morteros Antiguos de base orgánica Vegetal, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ingeniería Civil, UMNSH, 76-84.
- Camuffo, D. (1995) Physical weathering of stones, *The Science of the Total Environment* **167**, 1-14.
- Caneva, G., Gori, E., Montefinale, T. (1995) Biodeterioration of monuments in relation to climatic changes in Rome between 19-20<sup>th</sup> centuries, *The science of the Total Environment* **167**, 205-214.
- Carbonell De Masy, M. (1993) Conservación y restauración de monumentos, piedra, cal, arcilla, ISBN 84-604-8232-4, 45-51.
- Carrol, S.A., O'Day, P.A., Piechowski, M. (1998) Rock-Water Interactions Controlling Zinc, Cadmium, and Lead Concentrations in Surface Waters and Sediments, U.S. Tri-State Mining District. 2. Geochemical Interpretation, *Environmental Science and Technology* **32**(7), 956-965.
- Cas, R.A.F., Wright, J.V. (1988) Volcanic Successions, Modern and Ancient, Edit. Unwin-Hyman, London, Chapter 8, Ignimbrites and Ignimbrites Forming Eruptions, 233-266.
- Cercasov, V., Pantelica, A., Sálágean, M., Schreiber, H. (1996) Application of INAA and XRFA in a comparative environmental study, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **204**, 173-181.
- Cercasov, V., Pantelica, A., Sálágean, M., Scheiber, H. (1998) Comparative evaluation of some pollutants in the airborne particulate matter in eastern and Western Europe: Two-city study, Bucharest-Stuttgart. *Environmental Pollution* **108**, 331-337.

- Charlson, R.J., Schwartz, S.E., Hales, J.M., Cess, R.D., Coakley Jr., J.A., Hansen, J.E., Hofman, D.J. (1992) Climate forcing by anthropogenic aerosols. *Science* **255**, 423-430.
- Charola, A.E., Henriques, F.M.A. (1999) Lime mortars: some considerations on testing standardization, The Use of and Need for Preservation Standards in Architectural Conservation, ASTM STP 1355, Lauren B. Sickels-Taves (ed.), 142-151.
- Cheng, R.J., Castillo, R. (1984) A Study of Marble Deterioration at City Hall, Schenectady, New York, *Journal of the Air Pollution Control Association* **34(1)**, 15-19.
- Chung, N., Alexander, M. (1998) Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils, *Environmental Science and Technology* **32 (7)**, 855-860.
- Clifton, J.R., McClure, G. (1986) Performance Tests for Graffiti Removers, Cleaning Stone and Masonry, *ASTM Special Technical Publication* **935**, 14-24.
- Cobourn, W.G., Gauri, K.L., Tamblar, S., Li, S., Saltik, E. (1993) Laboratory measurements of sulfur dioxide deposition velocity on marble and dolomite stone surfaces, *Atmospheric Environment* **2**, 193-201.
- Colin, J.L., Jaffrezo, J.L., Gros, J.M. (1990) Solubility of major species in precipitation: factors of variation, *Atmospheric Environment* **24-A**, 537-544.
- Colloque International Alteration et Protection des Monuments en Pierre. Methods experimentales. Essais Recomendés pour mesurer l'altération des pierres et évalues l'efficacité des methods de truittent. UNESCO-Rilem, Volume 5, Paris, France June 5-9, 1978.
- Cooke, R.U., Gibbs, G.B. (1994) Crumbling Heritage? Studies of stone weathering in polluted atmospheres, *Atmospheric Environment* **28(7)**, 1355-1356.
- Coursimault, A., Donati, J., Viellard, H. (1995) La pollution Automobile due aux hydrocarbures aromatiques monocycliques á Paris, *The Science of the Total Environment* **169(1-3)**, 17-23.
- Cowel, D., Apsimon, H. (1996) Estimating the Cost of Damage to Buildings by Acidifying Atmospheric Pollution in Europe, *Atmospheric Environment* **30(17)**, 2959-2968.
- Del Monte, M., Sabbioni, C., Vittori, O. (1984) Urban stone sulphation and oil-fired carbonations particles, *Science of the Total Environment* **36**, 369-376.
- Diario Oficial de la Federación. NOM-CCAT-004-ECOL/1993. Octubre 22, 1993.
- Dolske, D.A. (1995) Deposition of atmospheric pollutants to monuments, statues, and buildings, *The Science of the Total Environment* **167**, 15-31.

- Duffy, A.P., Copper, T.P., Perry, S.H. (1993) Repointing mortars for conservation on a historic stone building in Trinity College, Dublin, *Material Structure* **26**, 302-306.
- Fassima, V. (1978) A survey of air pollution and deterioration of stonework in Venice. *Atmospheric Environment* **12**, 2205-2211.
- Felden, B.M. (1982) Conservation of Historic Buildings. Butterworth Architecture, Butterworth-Heinemann LTD, Chapter 7, 91-116.
- Fontaine, L., Thompson, M., Suter, G.T. (1999) Practice and Research: The Need of Standards for Historic Mortars, The Use of and Need for Preservation Standards in Architectural Conservation, ASTM STP 1355, Lauren B. Sickels-Taves (ed.), 158-174.
- García Rodríguez, L. (2001) Morteros de Albañilería para Restauración, de base orgánica animal, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ingeniería Civil, UMSH, 112-117.
- Goldstein, S.J., Slemmons, A.K., Canavan, H.E. (1996) Energy-Dispersive X ray Fluorescence Methods for Environmental Characterization of Soils, *Environmental Science and Technology* **30**( 7), 2318-2321.
- Griffiths, R.F., Roberts, I.D., Droplet evaporation from porous surfaces; model validation from field and wind tunnel experiments for sand and concrete, *Atmospheric Environment*, Pergamon; **33**, 3531-3549.
- Hamilton, R.S., Revitt, D.M., Vincent, K.J., Butlin, R.N. (1995) Sulphur and nitrogen particulate pollutant deposition on to building surfaces, *The Science of the Total Environment* **167**, 57-66.
- Haneef, J.S., Jones, S.M., Jonson, B.J., Tompson, E.G., Wood, C.G. (1993) Effects of air pollution on historic buildings and monuments (1986-1990). Scientific basis for conservation: laboratory chamber studies, *European Cultural Heritage* **7**(1-4), 2-10.
- Haneef, S.J., Johnson, J.B., Dickinson, C., Thompson, G.E., Wood, G.C. (1992) Effect of dry deposition of Nox and SO<sub>2</sub> gaseous pollutants on the degradation of calcareous building stones, *Atmospheric Environment* **16**, 2963-2974.
- Indoor Pollution News (1994); July 25, pp. 99
- Jacobs, P., Sevens, E., Kunnen, M. (1995) Principles of computerized Xray tomography and applications to buildings materials, *The Science of the Total Environment* **167**, 161-170.
- Jauregui, E. (1997) Heat island Development in Mexico City, *Atmospheric Environment* **32**(22), 3821-3831.
- Juárez Badillo, E., Rico Rodríguez, A. (1981) Mecánica de Suelos I, Fundamentos de la Mecánica de Suelos, Editorial Limusa, México, Tercera Edición, Séptima Reimpresión, 34-49.



- Jones, L.D. (1986) Criteria for Selection of a Most Appropriate Cleaning Method, Cleaning Stone and Masonry, *ASTM Special Technical Publication* **935**, 52-70.
- Kirkitsos, P., Sikiotis, D. (1996) Deterioration of Pentelic Marble, Portland limestone and Baumberger sandstone in Laboratory exposures to NO<sub>2</sub>; a comparison with exposures to gaseous HNO<sub>3</sub>, *Atmospheric Environment* **30(6)**, 941-950.
- Kohyama et al. (1978) Observation of the hydrated form of tubular halloysite by an electron microscope equipped with an environmental cell, *Journal of Clay and Clay Minerals* **26**, 25-40.
- Kono, Y., Osima, Y. (1971) Numerical experiments on the welding processes in pyroclastic flow deposits, *Bulletin of the Volcanic Society*, Jpn **16**, 1-14.
- Lajtai, E.Z., Schmidtke, R.H., Bielus, L.P. (1987) The effect of water on the time-dependet deformation and fracture of a granite, *Journal of Rock Mechanics Mineral Science* **24(4)** 247-255.
- Lal Gauri, K., Holdren, Jr, G.C. (1981) Pollutant effects on stone monuments, *Environmental Science and Technology* **15(4)**, 386-390.
- Lal Gauri, K., Vaughan, W.C. (1986) Cleaning Efflorescences from Masonry, Cleaning Stone and Masonry, *ASTM Special Technical Publication* **935**, 3-13.
- Lammel, G., Metzger, G. (1997) Pollutant Fluxes onto the Facades of a Historical Monument, *Atmospheric Environment* **31(15)**, 2249-2259.
- Lareau, T.J., Horst, R.L., Manuel, E.H., Lipfert, F.W. (1986) In Materials Degradation Caused by Acid rain; Baboian, R. (ed.); ACS Symposium Series 318; American Chemical Society; Washington, D.C., 397-410.
- Lazzarinni, L., Asmus, J.F., Marchesini, M.L. (1978) Lasers for the cleaning of statuary: initial results and potentialities, 1er Colloque International sur la deterioration des Pierres en oeuvre, International RILEM UNESCO Congress, Volume 2, Prevention and Treatment, La Rochelle, Paris, France, 89-94.
- Lee, Y.N., Schwartz, E.S. (1981) Evaluation of the rate of uptake of NO<sub>2</sub> by atmospheric and surface liquid water, *Journal of Geophysics Research* **86(11)**, 971.
- Leet, D.L., Judson, S. (2000) Fundamentos de Geología Física, Editorial Limusa, Decimonovena Reimpresión, 55-84.
- Lefohn, A.S., Husar J.D., Husar, R.B. (1999) Estimating historical anthropogenic global sulfur emissions patterns for the period 1850-1990, *Atmospheric Environment* **33**, 3435-3444.
- Leith, S.D., Reddy, M.M., Ramirez, W.F., Heymans, M.J. (1996) Limestone characterization to Model Damage from Acidic Precipitation: Effect of Pore Structure on Mass Transfer. *Environmental Science and Technology* **30**, 2201-2210.

- Leuzzi, G., Monti, P. (1998) Particle trajectory simulation of Dispersion Around a Building, *Atmospheric Environment* **32(2)**, 203-214.
- Leysen, L., Roekens, E., Van Grieken, R. (1989) Air-pollution-induced chemical decay of a sandy-limestone cathedral in Belgium. *The Science of the Total Environment* **78**, 263-287.
- Lothenbach, B., Furrer, G., Schulin, R. (1997) Immobilization of Heavy Metals by Polynuclear Aluminium and Montmorillonite Compounds, *Environmental Science and Technology* **31(5)**, 1452-1462.
- Magaloni, D., Pancella, R., Fruth, Y., Cañetas, J., Castaño, V. (1995) Studies on the Mayan Mortars Technique", Materials Research Society, Symposium Proceedings Volume **352**, 483-489.
- Marshall, P. (1935) Acid rocks of the Taupo-Rotorua volcanic district, Trans. R. Soc., N.Z. 64, 323-366.
- Martínez Gómez, L. (1989) Acero, Coedición de la Secretaría de Educación Pública, Fondo de Cultura Económica y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 14-32.
- Martínez Molina, W., Alonso, E., Villaseñor, L., Martínez Gómez, L. (2001) Efecto del agregado fino en la elaboración de concreto hidráulico, Ciencia Nicolaíta, Revista Cuatrimestral de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., 13-26.
- Mathur, R., Young, J.O., Schere, K.L., Gipson, G.L. (1998) A comparison of numerical techniques for solutions of atmospheric kinetic equations, *Atmospheric Environment* **32(9)**, 1535-1553.
- Meli Piralla, R. (1998) Ingeniería Estructural de los Edificios Históricos, Editado por Fundación ICA, 28-37.
- Monahan, E.C. (1986) The Ocean as source for atmospheric particles. In the Role of Air-Sea Exchange in Geochemical Cycling. NATO ASI SeriesC: Mathematical and Physical Sciences, Volume 185, Editorial P. Buat-Menard, 129-155. D. Reidel, Dordrecht.
- Moropoulou, A., Bisbikou, K., Torfs, K., van Grieken, R., Zezza, F., Macri, F. (1998) Origin and growth of Weathering crusts on Ancient Marbles in Industrial Atmosphere, *Atmospheric Environment* **32(6)**, 967-982.
- Newby, P.T., Mansfield, T.A., Hamilton, R.S. (1991) The sources and economic implications of building soiling in urban areas, *The Science of the Total Environment* **100**, 347-366.
- Nordstrom, D.K. (1982) Acid Sulfate Weathering, Soil Science Society of America; Madison, WI, 37-63.
- O'Brien, P.F., Bell, E., Pavia Santamaria, S., Boyland, P., Cooper, T.P. (1995) Role of mortars in the decay of granite, *The Science of the Total Environment* **167**, 103-110.

- O'Brien, P.F., Bell, E., Orr, T.L.L., Cooper, T.P. (1995) Stone loss rates at sites around Europe, *The Science of the Total Environment* **167**, 111-121.
- Ochoa Manzo, E. (2001) Estudio comparativo de morteros antiguos de base láctea, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ingeniería Civil, UMSNH, 350.
- Parungo, F., Nagamoto, C., Hoyt, S., Bravo, H.A. (1990) The investigation of air quality and acid rain over the Gulf of Mexico, *Atmospheric Environment* **4-A**, 109-123.
- Perez-Rodríguez, J.L., Maqueda, C., Jimenez de Haro, M.C., Rodriguez-Rubio, P. (1998) Effect of Pollution on Polychromed Ceramic Statues, *Atmospheric Environment* **32(6)**, 993-998.
- Perez-Rodríguez, J.L., Maqueda, C., Justo, A., Morillo, E., Jimenez de Haro, M.C. (1994) Characterization of decayed ceramic sculptures decorating the Pardon portico of Seville Cathedral, Spain, *Applied Clay Science* **9**, 211-223.
- Petuskey, W.T., Richardson, D.A., Dolske, D.A. (1995) Aspects of the deterioration of sandstone masonry in Anasazi dwelling ruins at Mesa Verde National Park, Colorado, USA. *The Science of the Total Environment* **167**, 145-149.
- Peyton, R.L., Haeffner, B.A., Anderson, S.H., Gantzer, C.J. (1992) Applying X ray CT to measure macropore diameters in undisturbed soil cores. A.R. Helmut, L.D. Norton (eds.) Digitization, processing and Quantitative Interpretation of Image Analysis in Soil science and Related Areas. *Geoderma* **53**, 329-340.
- Pie, K. (1987) Aeolian dust and dusts deposits, Academic Press, London.
- Pope, R.K., Ray, R.I., Little, B.J. (2000) Analysis of Hydrated Biological Specimens in the TEM: Pseudomonas Attachment to Corroding Iron, *The Americas Microscopy and Analysis* **43**, 15-17.
- Poruthoor, S.K., Dasgupta, P.K., Genfa, Z. (1998) Indoor Air Pollution and Sick Building Syndrome. Monitoring Aerosol Protein as a Measure of Bioaerosols, *Environmental Science and Technology* **32(8)**, 1147-1152.
- Qasrawi, H.Y. (2000) Concrete strength by combined nondestructive methods simply and reliably predicted, *Cement and Concrete Research* **30**, 739-746.
- Ramírez Romero, E. (1994) Zonas históricas de Morelia y Pátzcuaro ante el T.L.C., Instituto Michoacano de Cultura del Gobierno del Estado y UMNSH, 107-140
- Realini, M., Negrotti, R., Appollonia, L., Vaudan, D. (1995) Deposition of particulate matter on stone surfaces; an experimental verification of its effects on Carrara marble, *The Science of the Total Environment* **167**, 67-72.
- Reardon, E.J., Della Valle, S. (1997) Anion Sequestering by the Formation of Anionic Clays: Lime Treatment of Fly Ash Slurries, *Environmental Science and Technology* **31(4)**, 1218-1223



- Reglamento de Construcciones para el Distrito Federal, Arnal Simón, L. y Betancourt Suárez, M. Editorial Trillas, 2ª Reimpresión 1996, 653655.
- Reglamento de Construcciones para el Estado de Michoacán, Colegio de Ingenieros Civiles, Artículo 249 Mampostería Natural, 1999, 135-143.
- Riehle, J.R. (1973) Calculated compaction profiles of rhyolitic ash-flow tuffs, *Geological Society American Bulletin*, **84**, 2193-2216.
- Riley, W.J., Robinson, A.L., Gadgil, A.J., Nazaroff, W.W. (1998) Effects of variable wind speed and direction on random transport from soil into buildings: model development and exploratory results, *Atmospheric Environment*, **33**, 1998, 2157-2168.
- Rimstidt, J.D., Chermak, J.A., Gagen, P.M. (1994) Environmental Geochemistry of Sulfide Oxidation; Alpers, C.N., Blowes, D.W. (eds.) American Chemical Society; Washington, DC, 2-13.
- Robert, M., Verges-Belmin, V., Jaunet, A.M., Hevio, M., Bromblet, P.H. (1992) Mise en évidence de deux microsystèmes d'altération (chimique et physique) dans les monuments en granite (Bretagne), J. Delgado Rodriguez, F. Henriquez, F. Telmo Jeremias (eds.) Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, 1992, pp 129-138
- Rodríguez, M. (2001) Comunicación Personal, Consejo de la Ciudad del Centro Histórico, Morelia, Michoacán.
- Rodríguez Navarro, C., Sebastian, E. (1995) Role of particulate matter from vehicle exhaust on porous building stones (limestone) sulfation, *Science of the Total Environment* **187**, pp 79-91.
- Rubio, J.C., Alonso, E., Contreras, M.E., Martinez Gomez, L. (1998) Electron microscopy in cement mortars elaborated with volcanic sand from Morelia, Michoacan, Mexico. International Conference on Electron Microscopy ICEM 14, Cancun, Mexico, August 31 to September 4<sup>th</sup>, Symposium Z, Vol. II. M.E.
- Sabbioni, C. (1995) Contribution of atmospheric deposition to the formation of damage layers, *Science of the Total Environment*, **167** 49-55
- Sabbioni, C., Zappia, G., Ghenidi, N., Gobbi, G., Favioni, O. (1998) Black crusts on ancient mortars, *Atmospheric Environment* **32(2)**, 215-233.
- Saiz-Jimenez, C. (1995) Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiologia* **11**, 161-171.
- Saiz-Jimenez, C. (1993) Deposition of airborne organic pollutants on historic buildings, *Atmospheric Environment* **27-B**, 77-85.
- Salmon, L.G., Christoforou, C.S., Gerk, T.J., Cass, G.R., Casuccio, G.S., Cooke, G.A., Leger, M., Olmez, I. Source contributions to airborne particle deposition at the Yungang Grottoes, China, *The Science of the Total Environment* **165**, 33-47

- Saylor, R.D., Butt, K.M., Peters, L.K. (1992) Chemical characterization of precipitation from a monitoring network in the lower Ohio River Valley, *Atmospheric Environment* **26-A**, 1147-1156.
- Shao, J.F. (1998) Poroelastic behaviour of brittle rock materials with anisotropic damage, *Mechanics of Materials* **30**, 41-53.
- Sherwood, S.I. (1999) Balk and Caulk- Guidelines for repair of Joints in Historic Stone, The Use of and Need for Preservation Standards in Architectural Conservation, ASTM STP 1355, Lauren B. Sickels-Taves (ed.), 128-141.
- Schiavon, N., Zhou, L. (1996) Magnetic, Chemical, and Microscopical Characterization of Urban Soiling on Historical Monuments, *Environmental Science and Technology* **30(12)**, 3624-3629.
- Schiavon, N., Chiaviari, G., Schiavon, G., Fabbri, D. (1995) Nature and decay effects of urban soiling on granitic building stones, *The Science of the Total Environment* **167**, 87-101.
- Schifter, I. (2000) Personal Communication, IPM.
- Schlink, U., Herbarth, O., Tetzlaff, G. (1997) A component time-series models for SO<sub>2</sub> data: forecasting, interpretation and modification, *Atmospheric Environment* **31(9)**, 1285-1295.
- Sickels-Taves, L.B. (1999) The Use of and Need for Preservation Standards in Architectural Conservation, ASTM STP 1355, Lauren B. Sickels-Taves (ed.) and Architectural Conservator, Henry Ford Museum.
- Silva Ruelas, L. (1990) Los Materiales de Construcción de la Antigua Valladolid, Secretaría de Comunicaciones y Obras Públicas del Gobierno del Estado de Michoacán, 63.
- Silva Mandujano, G.(1984) La Catedral de Morelia, Arte y Sociedad de la Nueva España, Estudios Monográficos, Coedición UMSNH-Gob. Mich-Instituto Michoacano de Cultura, 49-74.
- Skoulikidis, T.N. (1993) 2<sup>nd</sup> Course: Stone Material in Monuments: Diagnosis and Conservation, Zezza, F. (ed.), Arti Grafiche Pugliesi: Bari, Italy, 139-154.
- Smith, R.L. (1960a) Ash Flows, *Geological Society American Bulletin* **71**, 795-842.
- Smith, R.L (1960b) Zones and zonal variations in welded ash-flows, US Geol. Surv. Prof. Pap., **354-F**, 149-159.
- Solebello, L. (1999) Polarized Light Microscopy in the Industrial Minerals Laboratory, *the Americas Microscopy and Analysis* **38**, 9-10.
- Sparks, R.S.J. (1976) Grain Size Variations in ignimbrites and implications for the transport of pyroclastic flows, *Sedimentology* **23**, 147-188.
- Sparks, R.S.J., Wilson, L. (1976) A model for the formation of ignimbrite by gravitational column collapse, *Journal Geol. Soc. London*, **132**, 441-452.



- Spiker, E.C., Comer, V.J., Hosker Jr, R.P., Sherwood, S.I. (1992) Dry deposition of SO<sub>2</sub> on limestone and marble: the role of humidity. Proceedings 7<sup>th</sup> International Congress on the Deterioration and Conservation of Stone, Lisboa, Portugal, 397-406.
- Spiker, E.C., Hosker, R.P., Comer, V.J., White, J.R., Were Jr., R.W., Harmon, F.L., Gandy, G.D., Sherwood, S.I. (1992) Environmental chamber for study of the depositions flux of gaseous pollutants to material surface, *Atmospheric Environment* **16** 2885-2892.
- Sweevers, H., Peeters, A., Van Grieken, R. (1995) Weathering of Leinster granite under ambient atmospheric conditions, *The Science of the Total Environment* **167**, 73-85.
- Tavera Alfaro, X. (1995) Morelia, Patrimonio de la Humanidad, Capítulo I, Coedición Universidad Michoacana, Gobierno del Estado de Michoacán y Ayuntamiento de Morelia, 11-25.
- Tavera Montiel, F. (1999) La Antigua Valladolid, hoy Morelia", Coedición Fac. Ing. Civil y UMSNH, ISBN 970-9056-72-7, 133-140.
- Tenorio Castilleros, D. (1997) Limpieza de Monumentos de Piedra con Rayo Láser, Seminario de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Piedra utilizando Técnicas Convencionales y Rayo Láser, Sala Sahún, Museo Nacional de Antropología e Historia, México, D.F.
- Thompson, M., Groot, C. (1999) RILEM TC Characterization of Old Mortars with Respect to Their Repair, The Use of and Need for Preservation Standards in Architectural Conservation, ASTM STP 1355, Lauren B. Sickels-Taves (ed.), 152-157.
- Tigue, D.B., Hoigard, K.R. (2000) Restoration of a Vintage Limestone Portico with Architectural Precast Concrete, Project Case Study Journal, January-February 2000, 88-91.
- Torfs, K., Van Grieken, R. (1997) Chemical relations between atmospheric aerosols, deposition and stone decay layers on historic buildings at the Mediterranean coast. *Atmospheric Environment* **31(15)**, 2179-2192.
- Torfs, K.M., Van Grieken, R.E., Buzek, F. (1997) Use of Stable Isotope Measurements to Evaluate the origin of Sulfur in Gypsum Layers on Limestone Buildings. *Environmental Science and Technology* **31(9)**, 2650-2655.
- Torraca, G. (1981) Porous Building Materials, ICCROM, Rome, Italy, 55-70.
- Turpin, B.J., Huntzicker, J.J. (1995) Identification of secondary organic aerosol episodes and quantitation of primary and secondary organic aerosol concentrations during SCAQS, *Atmospheric Environment* **29**, 3527-3544
- Villegas, M., Vázquez, X., Ríos, D., Baños, L., Magaloni, D. (1995) Relative Dating of the Stucco Relieves at Palenque, Chiapas, Based on Variation in Material Preparation, Materials Resesarch Society, Symposium Proceedings, Volume **352**, 469-481.



- Wadleigh, M.A., Blake, D.M. (1999) Tracing sources of atmospheric sulfur using epiphytic lichens, *Environmental Pollution* **106**, 265-271.
- Wilson, L., (1976) Explosive volcanic eruptions –III. Plinian eruption columns, *Geophys. Journal Research Astr. Society* **45**, 543-556.
- Winkler, E.M., (1985) A durability index for stone. Proceedings of the 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Lausanne, Switzerland.
- Xu, S., Lehmann, R.G., Miller, J.R., Chandra, G. (1998) Degradation of Polydimethylsiloxanes (Silicones) as Influenced by Clay Minerals. *Environmental Science and Technology, American Chemical Society* **32(9)**, 1199-1206.
- Yocom, J.E. (1979) Air pollution damage to buildings on the Acropolis, *Journal of the Air Pollution Control Association* **29(4)**, 333-338.
- Zappia, G., Sabbioni, C., Gobbi, G. (1993) Non-carbonate carbon content on black and white areas of damaged stones monuments, *Atmos, Environment* **27**, 1117-1122.
- Zappia, G., Sabbioni, C., Pauri, M.G., Gobbi, G. (1994) Mortar damage due to the airborne sulfur compounds in simulation chamber, *Material Structure* **27**, 469-473
- Zeza, F., Macrí, F. (1995) Marine Aerosol and Stone Decay, *The Science of the Total Environment* **167**, 123-143.